

**ESTUDOS TAXONÔMICOS E
ARMAZENAMENTO DE NEMATÓIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS (Rhabditida:
Steinernematidae, Heterorhabditidae)**

VANESSA ANDALÓ MENDES DE CARVALHO

2006

VANESSA ANDALÓ MENDES DE CARVALHO

**ESTUDOS TAXONÔMICOS E ARMAZENAMENTO DE NEMATÓIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS (Rhabditida: Steinernematidae,
Heterorhabditidae)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Entomologia, área de concentração em Entomologia Agrícola, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Alcides Moino Junior

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2006

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Carvalho, Vanessa Andaló Mendes de
Estudos taxonômicos e armazenamento de nematóides entomopatogênicos
(Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) / Vanessa Andaló Mendes de
Carvalho. – Lavras : UFLA, 2006.
182 p. : il.

Orientador: Alcides Moino Junior.
Tese (Doutorado) - UFLA.
Bibliografia.

1. Steinernema. 2. Heterorhabditis. 3. Insecta. 4. Controle biológico. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-595.182

VANESSA ANDALÓ MENDES DE CARVALHO

**ESTUDOS TAXONÔMICOS E ARMAZENAMENTO DE NEMATÓIDES
ENTOMOPATOGÊNICOS (Rhabditida: Steinernematidae,
Heterorhabditidae)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Entomologia, área de concentração em Entomologia Agrícola, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 15 de dezembro de 2006

Profa. Dra. Cláudia Dolinski	UENF
Dr. Maurício Sérgio Zacarias	EPAMIG
Prof. Dr. César Freire Carvalho	UFLA
Prof. Dr. Luis Cláudio Paterno Silveira	UFLA



Prof. Dr. Alcides Moino Junior
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, José Carlos e Márcia; ao meu irmão Lívio, aos meus avós Almiro e Prazeres e ao meu marido Carlos Alberto.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela oportunidade concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estágio de doutorando.

Ao professor Alcides Moino Junior pela amizade, orientação e dedicação durante todo o curso.

Ao pesquisador Dr. Khuong Nguyen, University of Florida, pela contribuição na execução do trabalho, ensinamentos transmitidos, incentivo e amizade.

Aos professores do Departamento de Entomologia pelos ensinamentos transmitidos e pelo estímulo e profissionalismo em relação à pesquisa e à educação.

Ao professor Ludwig Heinrich Pfenning (Departamento de Fitopatologia, UFLA) pelo incentivo e apoio.

À Dra. Myrian Silvana Tigano (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) pela amizade e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao professor Vicente Paulo Campos (Departamento de Fitopatologia, UFLA) pelo auxílio na execução do trabalho.

Aos amigos Giselle Souza, Grazielle Moreira, Juan Pablo Molina e Ricardo Cavalcanti pelo auxílio e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Nematologia, Cleber, Eduardo, Fátima, Fernando, José Mauro e Tarlei, pela amizade, apoio e ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Patologia de Insetos, Christiane, Marco Aurélio e Iuri.

Aos funcionários do Departamento de Entomologia, Elaine, Fábio, Lisiane, D. Ivone, Julinho e Nazaré, pelo auxílio prestado durante o curso.

Aos amigos Jussara Berlie, Ana Beatriz Mendes, Luis Carlos Mendes, Tatiana Goulart e Mila Lima pela amizade e carinho.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Sinceramente agradeço.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
INTRODUÇÃO GERAL	1
Referências Bibliográficas	4
ARTIGO 1. <i>Heterorhabditis amazonensis</i> n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil	6
Summary	7
Materials and Methods	10
Light microscopy	11
Morphology of bursa	11
Scanning electron microscopy	12
Molecular characterization	12
Results and discussion.....	15
Measurements	16
Description	16
Male	16
Female	17
Infective juvenile	19
Type host and locality	20
Type material	20
Diagnosis and relationships	21
Molecular analysis	22
DNA characterization	22
Phylogenetic relationships	23
Acknowledgments	24
References	25

ARTIGO 2. Efeito da temperatura e concentração na sobrevivência de nematóides entomopatogênicos em condições de armazenamento	43
Abstract	44
Resumen	45
Resumo	46
Introdução	47
Material e Métodos	49
Manutenção e multiplicação dos nematóides entomopatogênicos	49
Bioensaios para avaliação da temperatura e concentração no armazenamento dos nematóides entomopatogênicos	50
Determinação da viabilidade e infectividade de nematóides entomopatogênicos em armazenamento	52
Resultados e Discussão	53
Viabilidade de nematóides entomopatogênicos em armazenamento	53
Infectividade de nematóides entomopatogênicos sobre lagartas de <i>Galleria mellonella</i> após armazenamento	60
Referências Bibliográficas	67
ARTIGO 3. Influência da aeração no armazenamento de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida) em condições de laboratório	69
Resumo	70
Summary	71
Introdução	72
Material e Métodos	75
Manutenção e multiplicação dos nematóides entomopatogênicos	75
Bioensaios para avaliação da influência da aeração no armazenamento dos nematóides entomopatogênicos	77
Resultados e Discussão	78
Literatura Citada	82

ARTIGO 4. Influência do tempo e da temperatura na reserva lipídica de juvenis infectantes de nematóides entomopatogênicos em armazenamento....	89
Resumen	90
Abstract	91
Introdução	92
Material e Métodos	95
Multiplicação dos nematóides entomopatogênicos	95
Influência da temperatura e do tempo de armazenamento no percentual de lipídios de juvenis infectantes de nematóides entomopatogênicos e sua infectividade sobre de lagartas de <i>Galleria mellonella</i>	97
Resultados e Discussão	99
Influência da temperatura e do tempo de armazenamento no percentual de lipídios de juvenis infectantes de nematóides entomopatogênicos	99
Influência da temperatura e do tempo na infectividade de juvenis infectantes de nematóides entomopatogênicos sobre lagartas de <i>Galleria mellonella</i>	101
Literatura citada	115
ARTIGO 5. Avaliação de substâncias com potencial conservante no armazenamento de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae)	119
Resumo	120
Summary	121
Introdução	122
Material e Métodos	124
Multiplicação e manutenção dos nematóides entomopatogênicos	124
Avaliação da viabilidade e patogenicidade dos nematóides entomopatogênicos após armazenamento com substâncias com potencial conservante	126

Resultados e Discussão	127
Viabilidade de juvenis infectantes de nematóides entomopatogênicos armazenados em suspensão aquosa com diferentes substâncias com potencial conservante	127
Infectividade de juvenis infectantes de nematóides entomopatogênicos a lagartas de <i>Galleria mellonella</i> quando armazenados em suspensão aquosa com diferentes substâncias com potencial conservante	135
Literatura Citada	148
ARTIGO 6. Utilização de diferentes substratos para armazenamento de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae)	152
Abstract	153
Resumo	154
Material e Métodos	157
Multiplicação e manutenção dos nematóides entomopatogênicos	157
Avaliação de diferentes substratos no armazenamento de juvenis infectantes de nematóides entomopatogênicos	159
Resultados e Discussão	163
Referências Bibliográficas	174
CONSIDERAÇÕES FINAIS	182

RESUMO

CARVALHO, Vanessa. **Estudos taxonômicos e armazenamento de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae)**. 182 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Os nematóides entomopatogênicos estão sendo cada vez mais estudados; no entanto, apresentam baixa viabilidade em condições de laboratório. Assim, este trabalho teve como objetivos o estudo taxonômico de uma nova espécie de nematóide entomopatogênico isolado na região amazônica e o estudo das melhores condições para armazenamento, visando uso em programas de controle de pragas. Em um levantamento de nematóides entomopatogênicos da região amazônica foi obtido um isolado do gênero *Heterorhabditis*. De acordo com estudos morfológicos e moleculares, ele foi descrito como *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. Em relação ao armazenamento concluiu-se que, para os gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*, as temperaturas de 8, 12, 24 e 28°C influenciaram negativamente na sua sobrevivência e infectividade, enquanto 16 e 20°C prolongaram o tempo de armazenamento. Quando fornecida aeração, *Heterorhabditis* sp. JPM4 e *Steinernema carpocapsae* mantiveram-se viáveis por mais tempo do que sem fornecimento de oxigênio. Os nematóides mantiveram maiores reservas lipídicas quando em 8, 16 e 20°C, enquanto em 24 e 28°C a porcentagem de lipídios reduziu rapidamente. Apesar de em 8°C a reserva lipídica ter sido mantida, o mesmo não ocorreu com a infectividade. Quando usadas substâncias com potencial conservante, observou-se que a glicerina agiu preservando a sobrevivência dos juvenis infectantes (JI) a 28°C para os dois nematóides testados e também a 16°C para *S. carpocapsae*. As demais substâncias usadas, mesmo quando mantiveram os nematóides vivos, não mostraram esse efeito em relação à infectividade. Em relação ao uso de substratos no armazenamento, foi observado que após 180 dias, para *S. carpocapsae*, o substrato espuma manteve maior porcentagem de nematóides vivos (57,5%), enquanto para *Heterorhabditis* sp. JPM4, espuma, areia grossa e areia fina proporcionaram maior sobrevivência dos JI ao final de 180 dias (55,6%, 53,1% e 50,6%, respectivamente). As diferenças encontradas entre nematóides evidenciam a importância do estudo de fatores favoráveis para a manutenção de suas características em diferentes condições de armazenamento a fim de prolongar o tempo de sobrevivência e infectividade para fins de controle biológico de pragas.

*Orientador: Alcides Moino Junior - UFLA

ABSTRACT

CARVALHO, Vanessa. **Taxonomic studies and storage of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae)**. 182 p. Tese (Doctor in Entomology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Entomopathogenic nematodes are being each day more studied, however, their survival in laboratory conditions is low. Thus, the purpose of the present study was the identification of an entomopathogenic nematode from the Amazon region and the study of the best conditions for storage and posterior use in programs of pest control. In a survey of entomopathogenic nematodes in Brazil, a nematode isolate of the genus *Heterorhabditis* was found. Morphological and molecular studies of the isolate showed that the nematode is a new species described herein as *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. Regarding the storage, both genus *Heterorhabditis* as *Steinernema* had reduced infectivity at 8, 12, 24 and 28°C, while 16 and 20°C extended the storage time. When aeration was provided for *Heterorhabditis* sp. JPM4 and *Steinernema carpocapsae* the survival was higher than the treatment without aeration. The nematodes kept its lipid reserves for more time at 8, 16 and 20°C, while at 24 and 28°C the percentage of lipids reduced quickly. Despite at 8°C being considered the best adequate for the maintenance lipid reserve, it was not to keep infectivity. When studied the potential of preserving substances it was obtained that glycerin acted extending survival and infectivity at 28°C for both nematodes and also in 16°C for *S. carpocapsae*. The other substances tested, even when kept the nematodes alive, didn't show this effect in relation to infectivity. Regarding use of substrata, after 180 days, for *S. carpocapsae* A11 foam kept a greater percentage of infective juveniles (57.5%) alive than the others, while for *Heterorhabditis* sp. JPM4, foam, thick sand and fine sand provided greater survival at 180 days (55.6%, 53.1% and 50.6%, respectively). The differences in survival among entomopathogenic nematodes support the importance of this study of favorable factors for the maintenance of the characteristics in different storage conditions, in order to prolong the time of entomopathogenic nematodes survival and infectivity, to use in biological pest control.

* Adviser: Alcides Moino Junior - UFLA

INTRODUÇÃO GERAL

Os nematóides entomopatogênicos estão sendo cada vez mais estudados para o controle de pragas, pois possuem boa capacidade de adaptação a novos ambientes e têm capacidade de se disseminar em busca por um hospedeiro. A associação mutualística entre alguns nematóides e bactérias resulta em morte rápida dos insetos parasitados (Ferraz, 1998). Além disso, alguns produtos químicos apresentam sinergismo com nematóides entomopatogênicos, possibilitando redução na quantidade de produto aplicado, tempo e custo de aplicação (Koppenhöfer & Kaya, 1998).

A obtenção de nematóides entomopatogênicos é feita por meio de isolamentos realizados a partir de inseto infectado ou amostras de solo, podendo-se empregar, nesse caso, armadilhas vivas, funil de Baermann e centrifugação. O sucesso do isolamento depende ainda do tipo de distribuição apresentada pelos nematóides, pois eles não estão distribuídos ao acaso. Existem espécies consideradas dominantes e outras raramente encontradas, sendo que, para obtenção de novas espécies, torna-se necessária a coleta e análise de muitas amostras (Hominick, 2002). O isolamento de espécies de nematóides entomopatogênicos adaptadas às condições locais potencializa a utilização desses organismos, podendo contribuir para futuros programas de controle biológico de artrópodes-praga no Brasil, pois os índices de mortalidade podem ser maiores do que quando se utilizam nematóides importados de outras regiões.

Após o isolamento e confirmação de se tratar de um nematóide entomopatogênico, é necessário a identificação. Por muitos anos a identificação de nematóides entomopatogênicos foi feita através de estudos de morfologia e morfometria, por meio do uso de microscopia óptica ou eletrônica de varredura, sendo o método mais utilizado ainda hoje. Por meio da morfometria é feita a medição de estruturas do nematóide, as quais poderão ser comparadas

empregando chaves taxonômicas para identificação de gêneros e espécies. Além disso, há necessidade de consulta em descrições originais e, em muitos casos, material depositado em museus zoológicos, a fim de garantir a correta identificação da espécie (Adams & Nguyen, 2002). No entanto, atualmente é possível identificar isolados, ou mesmo novas espécies, com maior precisão, por meio de testes moleculares, que complementam os métodos anteriores (Alberts et al., 1994).

A produção de nematóides entomopatogênicos pode ser feita *in vivo* ou *in vitro*. A produção *in vivo* possibilita um produto estável e viável. Já a produção *in vitro*, devido à possibilidade de produção em larga escala, torna os produtos mais competitivos comercialmente (Neves et al., 1998).

Após o isolamento, identificação e produção do nematóide, poderá ser feito o armazenamento para posterior uso, porém a sobrevivência desses nematóides em condições de laboratório é baixa, com redução de mobilidade e infectividade (Westerman, 1999). As estratégias usadas pelos nematóides para a sobrevivência em condições adversas, tais como dessecação, congelamento, radiação ultravioleta, doenças e predação, são pouco conhecidas (Brown & Gaugler, 1997), além de terem persistência curta, sendo encontradas em raras ocasiões persistindo por estações ou anos (Lewis & Shapiro-Ilan, 2002).

Diversos fatores podem influenciar na sobrevivência dos nematóides entomopatogênicos durante o armazenamento. Dentre esses, a temperatura é um importante fator que influencia tanto na sobrevivência como na mobilidade e infectividade (Glazer, 2002). Outro aspecto relevante é o oxigênio, pois sua disponibilidade para o nematóide é determinada principalmente pelo seu nível no ambiente (Qiu & Bedding, 2000).

Várias substâncias podem ser adicionadas em suspensão aquosa de nematóides, como anti-dessecantes (Broadbent & Olthof, 1995), ou então, substratos podem ser usados para prolongar a sobrevivência dos nematóides

armazenados (Kaya & Stock, 1997). A principal fonte de energia dos juvenis infectantes é a sua reserva lipídica. Por meio dessa reserva, os nematóides irão manter-se vivos até encontrarem um novo hospedeiro para parasitar. O estoque de lipídios pode interferir diretamente na sobrevivência e infectividade do nematóide (Van Gundy, 1985).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo o estudo taxonômico de um nematóide entomopatogênico isolado da região amazônica, em Benjamin Constant, e de algumas condições para melhor armazenamento de nematóides entomopatogênicos em laboratório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 1-34.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. Garland: New York, 1994. 1294 p.

BROADBENT, A. B.; OLTHOF, T. H. A. Foliar application of *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) to control *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) larvae in chrysanthemums. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 24, n. 2, p. 431-435, Apr. 1995.

BROWN, I. M.; GAUGLER, R. Temperature and humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematodes. **Nematologica**, Leiden, v. 43, p. 363-375, Sept. 1997.

FERRAZ, L. C. C. B. Nematóides entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.541-569.

GLAZER, I. Survival biology. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 169-188.

HOMINICK, W. M. Biogeography. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic nematology**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 115-143.

KAYA, H. K.; STOCK, P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L. **Manual of techniques in insect pathology**. New York: Academic Press, 1997. p. 281-324.

KOPPENHÖFER, A. M.; KAYA, H. K. Synergism of imidacloprid and an entomopathogenic nematode: a novel approach to white grub (Coleoptera: Scarabaeidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, n. 3, p. 618-623, 1998.

LEWIS, E. E.; SHAPIRO-ILAN, D. Host cadavers protect entomopathogenic nematodes during freezing. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 81, n. 1, p. 25-32, Oct. 2002.

NEVES, P. J.; ALVES, S. B.; AGUILLERA, M. M. Produção de nematóides entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 889-905.

QIU, L.; BEDDING; R. A. Energy metabolism and survival of the infective juveniles of *Steinernema carpocapsae* under oxygen-deficient conditions. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 32, n. 3, p. 271-280, 2000.

VAN GUNDY, S. D. Ecology of *Meloidogyne* spp.-emphasis on environmental factors affecting survival and pathogenicity. In: SASSER, J. N.; CARTER, C. C. **An advanced treatise on Meloidogyne**. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. p. 177-182.

WESTERMAN, P. R. Aggregation of entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp., among host insects at 9 and 20°C and effects on efficacy. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 73, n. 2, p. 206-213, Mar. 1999.

ARTIGO 1

Heterorhabditis amazonensis n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil (Preparado de acordo com as normas da revista “Nematology”. Publicado: v. 8, n. 6, p. 853-867, 2006)

VANESSA ANDALÓ¹

KHUONG B. NGUYEN²

ALCIDES MOINO JR¹

¹Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG.

²Entomology & Nematology Department, University of Florida, Gainesville, FL 32601-0620, USA.

Heterorhabditis amazonensis n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from
Amazonas, Brazil

Summary – In a survey of entomopathogenic nematodes in Brazil, a nematode isolate of the genus *Heterorhabditis* was found. The nematode was collected from soil by the insect-baiting technique and maintained in the laboratory on last instar *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) larvae. Morphological and molecular studies of the isolate showed that the nematode is a new species. Light and scanning electron microscopy, DNA characterization and phylogeny were used for this description. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. is morphologically similar to *H. baujardi*, *H. floridensis*, *H. mexicana*, and *H. indica*, and can be distinguished from these species mainly by male and female characters. Fifty percent of *H. amazonensis* males have two pairs of bursal papillae in the terminal group; 25% with two papillae on one side and one papilla on the other side and 25% with one pair of papillae. Twenty percent of the population has a curved gubernaculum. The percentage of the gubernaculum to spicule length (GS%) is lower than that of *H. mexicana* (50 vs 56), and the length of the spicule relative to anal body width (SW%) is lower than that of *H. mexicana* (152 vs 167) and *H. baujardi*

(152 vs 182). The female can be differentiated from related species by its unique vulva pattern. In a phylogenetic tree, the new species, *H. floridensis*, *H. baujardi* and *H. mexicana* form a monophyletic group, sister group to *H. indica*. The new species has evolved three autapomorphic nucleotide character states, differing from its sister taxa *H. mexicana* at 22, and *H. baujardi* at 15 aligned positions.

Keywords – entomopathogenic nematodes, ITS rDNA, morphology, SEM, systematics, taxonomy.

Entomopathogenic nematodes (EPN) of the family Heterorhabditidae and Steinernematidae have been used successfully for biological control of insects (Klein, 1990; Shapiro-Ilan et al., 2002). Currently, over 48 species of *Steinernema* and ten species of *Heterorhabditis* (Nguyen, 2006) have been validly described, and the number of nominal species is increasing rapidly. Hominick (2002) reported that the number of EPN species described up to 2002 was 34, of which 23 were described between 1989-2002. The nematodes seem to be present all over the world.

In Brazil, several species have been discovered and identified. The first record of EPN in Brazil was by Pizano et al. (1985). These authors reported that infective juveniles of *Neoaplectana glaseri* Steiner, 1929 (now called *Steinernema glaseri*), were found in an egg of *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Cerambycidae) in Usina Amalia, State of São Paulo. In 1990, Poinar reported *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1975 in Pernambuco state. Hominick (2002) reported that *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding 1982 was found in Brazil. Recently, Valle et al. (2005) collected an isolate of *Heterorhabditis baujardi* Phan, Sabbotin, Nguyen

& Moens, 2003 from Rondônia state, and Machado et al. (2005) isolated *S. glaseri* in Araras, São Paulo and *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunakar & David, 1992 in Itapetininga, State of São Paulo.

In a survey of entomopathogenic nematodes in Benjamin Constant, Amazonas state, Brazil, a nematode isolate of the genus *Heterorhabditis* Poinar, 1975 was found. The new species is described herein as *Heterorhabditis amazonensis* n. sp.

Materials and methods

Nematodes were collected from soil by the insectbaiting technique (Bedding & Akhurst, 1975) using *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) larvae and maintained in the laboratory on the last larval instar of this insect (Dutky et al., 1964). For morphological studies, ten larval *G. mellonella* were exposed to *ca* 300 infective juveniles (IJ) in a Petri dish (100 × 15 mm) lined with two moistened filter papers. The first generation hermaphrodites, second generation females and males were obtained by dissecting infected insects at 3-4 days and 6-7 days, respectively, after the insect died. Third-stage infective

juveniles were obtained during the first 2 days after emerging from insect cadavers (Nguyen & Smart, 1995a).

LIGHT MICROSCOPY

For light microscope observations, 20 males, 20 females and 20 IJ were examined alive. Additional specimens of different stages were killed and fixed in either triethanolamine formalin (TAF) as suggested by Courtney et al. (1955) or lactophenol (Franklin & Goody, 1949). These nematodes were used when more observations were needed to confirm the morphology or variation of some structures. Nematodes fixed in TAF were processed to glycerin using the Seinhorst method (Seinhorst, 1959). Type specimens were mounted in glycerin. Cover glass supports were used in all cases to avoid flattening of the specimens.

MORPHOLOGY OF BURSA

The preparation of the bursa was done using the method reported by Nguyen et al. (2004). The nematodes were reared and collected as stated above. Twenty-four males were transferred into a small drop of lactophenol (with 0.002% acid fuchsin) on a hot plate at 65-70°C. After

30 min, a male was transferred to a drop of lactophenol on a glass slide. The anterior three-fourths of the body was severed and removed. A cover glass was placed on top of the drop of lactophenol containing the posterior part of the nematode. The cover glass was moved slowly by a needle to rotate the posterior part of the nematode to a ventral view.

SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM)

Adults and IJ were fixed in 3% glutaraldehyde buffered with 0.1 M sodium cacodylate at pH 7.2 for 24 h at 8°C. They were post-fixed with 2% osmium tetroxide solution for 12 h at 25°C, dehydrated in a graded ethanol series, critical point dried with liquid CO₂, mounted on SEM stubs, and coated with gold. Spicules and gubernacula were prepared as suggested by Nguyen & Smart (1995b).

MOLECULAR CHARACTERIZATION

The other species of the genus *Heterorhabditis* used in this study were: *H. bacteriophora* strain HP88; *H. baujardi* strain Vietnam; *H. downesi* Stock, Griffin & Burnell, 2002 strain K122; *H. floridensis* Nguyen, Gozel, Koppenhöfer & Adams, 2006; *H. indica* strain India;

H. marelatus Liu & Berry, 1996 strain OH10; *H. megidis* Poinar, Jackson & Klein, 1987 strain AGC; *H. mexicana* Nguyen, Shapiro-Ilan, Stuart, McCoy, James & Adams, 2004 strain MX4; and *H. zealandica* Poinar, 1990 strain Florida. All of these sequences were from Nguyen et al. (2004; 2006). All accession numbers are cited on the phylogenetic tree.

DNA was extracted from a single hermaphroditic female as described by Nguyen et al., 2001; 2004; 2006 and the entire internally transcribed spacer regions (ITS) were PCR (polymerase chain reaction) amplified using the primers 18S: 5_-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3_ (forward) and 26S: 5_-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3_ (reverse). All PCR reactions were conducted in a Gradient Thermocycler, PTC-200 (MJ Research, Inc., Waltham, MA, USA) with the cycle profile: 1 cycle of 94°C for 7 min followed by 35 cycles at 94°C for 60 s; 45°C for 60 s; and 72°C for 60 s. The last step was 72°C for 10 min. PCR products were sequenced bi-directionally in their entirety. Internal primers used for sequencing were: 58P = 5_-ACGAATTGCAGACGCTTAG-3_ (forward) and H58R = 5_-GTGCGTTCAAACCTTCACC-3_ reverse) (Nguyen et al., 2004). Sequences of the complete ITS array were aligned to previously

published sequences of the ITS region (Nguyen et al., 2006) using the profile alignment option of Clustal X (Thompson et al., 1997), then optimized manually in MacClade 4.05 (Maddison & Maddison, 2002) softwares.

Phylogenetic analysis was performed using PAUP* software (Swofford, 2002). For the parsimony analysis, the shortest trees were obtained using the branch and bound algorithm. Gaps in the matrix were treated as either missing data or as a fifth base. *Pellioiditis typica* (Stefanski, 1922) Andrassy, 1983 (Rhabditidae) and *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1889) (Rhabditidae) were used as outgroup taxa and to root the tree. For ML (maximum likelihood) analysis, models of sequence evolution were evaluated using Modeltest 3.07 (Posada & Crandall, 1998). Modeltest utilises likelihood ratio tests which favoured the TVM + G model with a 0.8845 gamma distribution shape parameter. The maximum likelihood tree was inferred using a neighbour-joining starting tree, with heuristic searching of tree space by TBR branch swapping. Branch support was estimated by bootstrap analysis (1000 replicates for maximum probability (MP) and 100 replicates for ML) using the same parameters as the original search. For further species delimitation, we

traced the phylogenetic relationships among *Heterorhabditis* species and map of ITS character states that could be polarised unambiguously (MacClade 4.05 software). This process shows the numbers of transition/transversion sites and autapomorphies (unique, derived characters) that, when fixed within and among lineages, indicate lineage independence.

Results and discussion

Morphological characters, morphometrics and molecular data show that the nematode specimens studied represent a new species, herein described as *Heterorhabditis amazonensis* Andaló, Nguyen & Moino Jr. (Rhabditida: Heterorhabditidae).

***Heterorhabditis amazonensis*^{*} n. sp.**

(Fig. 1-8)

* The species epithet is derived from *Amazonas*, Brazil, the state from where the species was obtained.

MEASUREMENTS

See table 1.

DESCRIPTION

Male

Body curved ventrally when killed by gentle heat. Head truncate, sometimes slightly swollen. Face view with six labial papillae, cephalic papillae not observed. Amphidial apertures prominent. Stoma with sclerotised rod-shaped cheilorhabdions; other rhabdions not distinguishable, forming a funnel-shaped structure posterior to cheilorhabdions. Pharynx with cylindrical corpus, metacarpus sometimes slightly enlarged. Nerve ring surrounding isthmus just anterior to basal bulb. Basal bulb with reduced valve. Cardia present, protruding into intestine. Excretory pore usually located posterior to basal bulb. Testis monorchic, reflexed; distance from end of basal bulb to testis flexure variable. Vas deferens well developed. Spicules paired, separate, rostrum absent, ventral side flattened. Gubernaculum well curved ventrally in 20% of the population, slightly curved ventrally in 20%. Bursa peloderan. Bursal papillae numbering 7-8 pairs. From anterior to posterior, pair 1

well anterior with papilla tips extending beyond bursal rim; pairs 2 and 3 in a group anterior to cloaca, also extending beyond bursal rim. Pairs 4, 5 and 6 forming a group, situated posterior to cloaca, pair 4 usually not curved outward (laterally). Number of genital papillae from one to six (from anterior end) typical for *Heterorhabditis* spp. (Nguyen et al., 2004). Pairs 7 and 8 forming a terminal group of papillae at end of bursa. Number and distribution of papillae in terminal group variable. Observation of terminal group papillae in 24 bursas gave following results: 50% with two pairs of papillae; 25% with two papillae on one side and one papilla on other side; and 25% with one pair of papillae. Tail conoid, slightly curved ventrally (Fig 1-3).

Female

Hermaphroditic female C-shaped after killing with gentle heat, body robust, always with many eggs in young females and many eggs and juveniles in mature females. Cuticle smooth under light microscope but finely annulated under SEM. Lateral field and phasmid not observed. Head region tapering anteriorly. Labial region with six prominent lips, each lip with a terminal labial papilla. Cephalic papillae not observed

with SEM. In face view, mouth hexagonal in shape. Amphidial aperture pore-like. Stoma with refractile cheilorhabdions. Posterior part of stoma funnel-shaped, enclosed by anterior part of pharynx. Pharynx with cylindrical corpus. Isthmus present. Nerve ring located at middle of isthmus. Basal bulb prominent with inconspicuous valve, but lumen of pharynx in basal bulb well sclerotised. Cardia present. Gonads didelphic, amphidelphic.

Vulva in form of a transverse slit, located on a slightly protuberant area, anterior to mid-body. In ventral view, vulva top smooth, elliptical, surrounded by unique pattern. Pattern in form of a rough area radiating from vulva opening. Close to opening, many wart-like structures were observed. This pattern is present on all hermaphroditic females and different from that of closely related species. Vagina short. Tail longer than anal body diameter, conoid with pointed terminus. Tail sometimes widening near end then narrowing to a pointed tip. Post-anal swelling present, sometimes (20%) with two papillalike structures. Phasmid inconspicuous. Amphimictic female similar to hermaphroditic female but smaller. Vulva rarely protuberant, usually (80%) covered with exudates or copulation plug. Post-anal swelling much smaller (Fig. 5-6).

Infective juvenile

Body elongate. Sheath (second-stage cuticle) present immediately after harvesting, but many infective juveniles (IJ) losing sheath in storage. Ensheathed IJ with body length close to that of *H. bacteriophora* and *H. mexicana*. Labial region with seven annules, lacking longitudinal incisures. Anterior part of body (*ca* 3-5 body diameter from anterior end) with tessellate pattern. Posterior part with longitudinal ridges. Tail long, pointed. Exsheathed IJ body annulated, without longitudinal ridges. Labial region with dorsal tooth, labial and cephalic papillae absent. Amphidial aperture prominent. Excretory pore located posterior to nerve ring but just anterior to base of pharynx. Hemizonid, when observed, located 2-3 annules anterior to excretory pore. Pharynx typical for *Heterorhabditis*. Lateral field beginning anteriorly with one ridge, but a short distance posteriorly (2-3 body diameter), a second ridge occurs, thus forming two ridges. Two-ridge lateral field pattern unchanged for remainder of body. Phasmid in lateral field, pore-like, prominent, located near mid-tail. Tail elongate conoid with pointed terminus. Tail length without sheath *ca* 65% of tail length with sheath (Fig. 1; Fig.4).

TYPE HOST AND LOCALITY

Natural host not known. Nematodes were collected by baiting from a forest in the northern part of the state of Amazonas, near the city of Benjamin Constant. GPS coordinates 4°25'20,8''S and 69°54'49,7''W.

TYPE MATERIAL

Holotype (male), allotype (female) and paratypes (hermaphrodites, females, male and infective juveniles in 3% formalin) isolated from haemocoel of *G. mellonella* deposited in the United States Department of Agriculture Nematode Collection (USDANC), Beltsville, Maryland, USA. Slide of one male and one female paratype of the second generation, and several infective juveniles deposited in the California Collection of Nematodes, University of California-Davis Nematode Collection, Davis, California, USA. Several paratype hermaphrodites, females, male, and all stages in 3% formalin deposited in the Entomology and Nematology Department, University of Florida, Gainesville, Florida, USA.

DIAGNOSIS AND RELATIONSHIPS

Heterorhabditis amazonensis n. sp. is characterized by a combination of morphological and morphometric characters of the male, female and IJ. For males, the number of papillae in the terminal group of bursa is variable either with two pairs of papillae (50%; Fig. 3A), with two papillae on one side and one papilla on the other side, (25%; Fig. 3B), or with one pair of papillae (25%; Fig. 3C). Twenty percent of the population has a well-curved gubernaculum. The percentage of the gubernaculum to spicule length (GS%) is 51, similar to *H. baujardi* but lower than *H. mexicana* (50 vs 56), and the length of the spicule relative to anal body diameter (SW%) is 152, lower than that of *H. mexicana* (167) and *H. baujardi* (182). The D% (distance from anterior end/pharynx length \times 100) of the three nematodes is also different. Females possess a typical vulva pattern (Fig. 6B). This pattern is different from other closely related species as in Figure 5 of Nguyen et al. (2006). The IJ has a body length of 589 (567-612) μm , EP = 107 (89-115) μm , ES = 121 (107-132) μm , tail length = 107 (98-115) μm , and a = 26 (24-29).

Heterorhabditis amazonensis n. sp. is morphologically similar to *H. floridensis*, *H. baujardi*, *H. mexicana* and *H. indica*, and can be

distinguished from these species mainly by male and IJ characters (Tables 2, 3). The new species can be distinguished from *H. bacteriophora*, *H. indica*, *H. megidis*, *H. zealandica* and *H. marelatus* by the body length, pharynx length of the IJ, D%, GS% and SW% of males. This new species can be further characterised by molecular characteristics of ITS regions of ribosomal DNA.

MOLECULAR ANALYSIS

DNA characterization

The ITS rDNA regions, flanked by primers 18S and 26S, of *H. amazonensis* n. sp. are characterized by the sequence lengths (1010 base pairs [bp], ITS1 = 395 bp, ITS2 = 211 bp), and nucleotide usage composition (Table 4). Compared to sequences of nine other species in the genus *Heterorhabditis*, the sequence length of the new species is longer than that of six other species, the same length as that of *H. mexicana* and shorter than that of *H. bacteriophora* (1021 bp) and *H. floridensis* (1012 bp). The ITS1 sequence length of the new species (195 bp) is longer than that of all other species (1-25 bp longer); it is only

one bp longer than that of *H. mexicana* (ITS1 = 394 bp). The sequence length of the ITS2 region of the new species, 211 bp, is the same as that of *H. bajardi* and *H. marelatus* but shorter than that of all other species (Table 4).

The nucleotide composition of all ten species of *Heterorhabditis* is presented in Table 4. The reconstructed nucleotide character transformations show that the new species differs from its closest taxon *H. bajardi* at 15 aligned positions, three of which are unambiguous, polarised autapomorphies. It is most divergent from *H. zealandica* (184 aligned positions; Table 5). Genetic distances between the new species, which are presented in Table 5, also can be used to differentiate species in the genus *Heterorhabditis*.

Phylogenetic relationships

Maximum parsimony (MP) analysis of ITS regions yielded a single most parsimonious tree (tree length = 847, CI = 0.8595, RI = 0.7959; Fig. 8). The parsimonious tree includes two monophyletic groups, which are well supported (90%, regular numbers) by bootstrap analysis. The new species together with *H. bajardi*, *H. floridensis*, *H. indica* and

H. mexicana comprise a monophyletic group (100% support) that we call the ‘*indica*-group’ in which *H. indica* is a sister taxon to the group formed by the other four species, and *H. amazonensis* n. sp. is a sister taxon to the group formed by *H. floridensis*, *H. baujardi* and *H. mexicana*. All other species (*H. bacteriophora*, *H. downesi*, *H. marelatus*, *H. megidis* and *H. zealandica*) comprise another monophyletic group that we call the ‘*megidis*-group’. Maximum likelihood analysis of ITS regions generated a tree (Figs 7, 8) with a topology identical to that of the MP tree, but branch support (bold numbers) are weak for some nodes, especially in the *megidis*-group.

Morphological and molecular characteristics that we uncovered are sufficient to conclude that *H. amazonensis* is a new species.

Acknowledgments

The authors thank the EM Core, University of Florida, for the scanning microscope used to produce SEM photographs for this paper. Financial support to A. Moino Jr. from BIOSBrasil Project/CSM-BGBD/GEF/UNEP is gratefully acknowledged. They are also grateful to Dr. G. C. Smart Jr. and P. Howell for critically reading the manuscript.

References

BEDDING, R. A.; AKHURST, R. J. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. **Nematologica**, Leiden, v. 21, n. 1, p. 109-110, 1975.

COURTNEY, W. D.; POLLEY, D.; MILLER, V. I. TAF an improved fixative in nematode technique. **Plant Disease Reporter**, Saint Paul, v. 39, n. 6, p. 570-571, June 1955.

DUTKY, S. R.; THOMPSON, J. V.; CANTWELL, G. E. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. **Journal of Insect Pathology**, San Diego, v. 6, n. 4, p. 417-422, 1964.

FRANKLIN, M.; GOODEY, J. B. A cotton blue lactophenol technique for mounting plant-parasitic nematodes. **Journal of Helminthology**, London, v. 23, p. 175-178, 1949.

HOMINICK, W. M. Biogeography. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic nematology**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 115-143.

KLEIN, M. G. Efficacy against soil-inhibiting insect pests. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 195-214.

MACHADO, L. A.; HABIB, M.; LEITE, L. G.; CALEGARI, L. C.; GOULART, R. M.; TAVARES, F. M. Pathogenicity of entomopathogenic nematodes to eggs and larvae of *Migdolus fryanus* (Weswood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 221-226, abr./jun. 2005.

MADDISON, W. P.; MADDISON, D. R. **MacClade version 4.0**. Massachusetts: Sinauer Associates, 2002. 1 CD.

NGUYEN, K. B. **Morphology and taxonomy of entomopathogenic nematodes**. Disponível em: <<http://kbn.ifas.ufl.edu/kbnstein.htm>>. Acesso em: 10 jun. 2006.

NGUYEN, K. B.; SMART JR., G. C. Morphometrics of infective juveniles of *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nemata: Rhabditida). **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 27, n. 2, p. 206-212, June 1995a.

NGUYEN, K. B.; SMART JR., G. C. Scanning electron microscope studies of *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae). **Nematologica**, Leiden, v. 41, n. 2, p.183-190, Mar. 1995b.

NGUYEN, K. B.; MARUNIAK, J.; ADAMS, B. J. Diagnostic and phylogenetic utility of the rDNA internal transcribed spacer sequences of *Steinernema*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 33, n. 2-3, p. 73-82, June/Sept. 2001.

NGUYEN, K. B.; GOZEL, U.; KOPPENHÖFER, H. S.; ADAMS, B. J. *Heterorhabditis floridensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Florida. **Zootaxa**, Auckland, v. 1177, p.1-19, Apr. 2006.

NGUYEN, K. B.; SHAPIRO-ILAN, D.;I.; STUART, R. J.; MCCOY, C. W.; JAMES, R. R.; ADAMS, B. J. *Heterorhabditis mexicana* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Tamaulipa, Mexico, and morphological studies of the bursa of *Heterorhabditis* spp. **Nematology**, Leiden, v. 6, n. 2, p. 231-244, Mar./Apr. 2004.

PHAN, K. L.; SUBBOTIN, S. A.; NGUYEN, N. C.; MOENS, M.
Heterorhabditis baujardi sp. n. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from
Vietnam and morphometric data for *H. indica* populations. **Nematology**,
Leiden, v. 5, n. 3, p. 367-382, May/June 2003.

PIZANO, M. A.; AGUILLERA, M. M.; MONTEIRO, A. R.; FERRAZ,
L. C. C. B. Incidência de *Neoaplectana glaseri* Steiner, 1929 (Nematoda:
Steinernematidae) parasitando ovos de *Migdolus fryanus* (Weswood,
1863) (Col: Cerambycidae). **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 9, p.
9-10, 1985.

POINAR JR., G. O. Taxonomy and biology of Steinernematidae and
Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. **Entomopathogenic
nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 23-60.

POINAR JR., G. O.; KARUNAKAR, G. K.; DAVID, H. *Heterorhabditis
indicus* n. sp. (Rhabditida, Nematoda) from India: separation of
Heterorhabditis spp. by infective juveniles. **Fundamental and Applied
Nematology**, Paris, v. 15, n. 5, p. 467-472, 1992.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Model test: testing the model of DNA
substitution. **Bioinformatics**, Oxford, v. 14, n. 9, p. 817-818, Oct. 1998.

SEINHORST, J. W. A rapid method for the transfer of nematodes from
fixative to anhydrous glycerin. **Nematologica**, Leiden, v. 4, n. 1, p. 67-69,
1959.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; GOUGE, D. H.; KOPPENHÖFER, A. M. Factors
affecting commercial success: case studies in cotton, turf and citrus. In:
GAUGLER, R. **Entomopathogenic nematology**. Wallingford: CABI
Publishing, 2002. p. 333-356.

SWOFFORD, D. L. **PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)**. Massachusetts: Sinauer Associates, 2002. 1CD-ROM.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, Dec. 1997.

VALLE, E. E.; DOLINSKI, C.; SOUZA, R. M.; SAMUELS, R. I. Evaluation of selection methods for tolerance to high temperatures using *Heterorhabditis baujardi* (Nematoda: Rhabditida). **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 199-205, dez. 2005.

Table 1. Morphometrics (μm) of *Heterorhabditis amazonensis* n. sp.Measurements are in the form: mean \pm sd (range).

Character	Holotype	Male	Hermaphrodite	Female	IJ
n		20	20	20	20
Body length (L)	709	752 \pm 43 (692-826)	4734 \pm 664 (3517-5587)	1580 \pm 180 (1279-2070)	589 \pm 12 (567-612)
a (L/D)					26 \pm 1.3 (24-29)
b (L/ES)					4.9 \pm 0.3 (4.4-5.5)
c (L/T)					5.5 \pm 0.2 (5.1-6.1)
V			44 \pm 1.5 (42-47)	48 \pm 1 (46-50)	
Greatest body diam. (D)	41	41 \pm 2.3 (36-43)	282 \pm 25 (220-316)	100 \pm 13 (70-122)	23 \pm 1.2 (20-24)
Stoma length			13.8 \pm 2.7 (10.1-17.4)	8.8 \pm 1 (7.2-10.1)	
Stoma width			12.7 \pm 1.6 (11.6-16)	8.1 \pm 1 (7.2-8.7)	
EP	94	109 \pm 6 (96-116)	211 \pm 14 (184-238)	114 \pm 7.8 (103-126)	107 \pm 6.1 (89-115)
NR		79 \pm 5 (71-88)	149 \pm 12 (128-171)	85 \pm 9 (68-100)	85 \pm 4.9 (76-93)
ES	90	105 \pm 5 (97-114)	206 \pm 15 (180-225)	130 \pm 7.1 (119-142)	121 \pm 6.6 (107-132)
Testis reflexion	70	59 \pm 10 (42-85)			
Tail length (T)					107 \pm 4.7 (98-115)
T without sheath	25	33 \pm 2.7 (29-41)	128 \pm 14 (104-154)	74 \pm 12 (58-91)	69 \pm 4.4 (59-74)
Anal body diam. (ABD)	22	27 \pm 2.6 (23-33)	70 \pm 6.5 (59-83)	30 \pm 3.7 (25-38)	14 \pm 1.4 (13-17)
Spicule length (SP)	34	41 \pm 2.9 (35-45)			

...continue...

Table 1, Cont.

Character	Holotype	Male	Hermaphrodite	Female	IJ
Gubern. Length (GU)	17	21 ± 1.5 (19-23)			
D% = EP/ES x 100	104	103 ± 3.7 (95-109)			88 ± 2.7 (83-92)
E% = EP/T x 100					100 ± 6.0 (89-109)
SW% = SP/ABD x 100	154	152 ± 20 (120-187)			
GS% = GU/SP x 100	50	51 ± 3.2 (44-56)			
Hyaline/Tail x 100					64.7 ± 5.3 (52-74)

IJ = infective juvenile; n = number of specimens measured; EP = distance from anterior end to excretory pore; NR = distance from anterior end to nerve ring; ES = distance from anterior end to end of pharynx; V = distance from anterior end to vulva/body length x 100.

Table 2. Comparative morphometrics (μm) of male of *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. and other related species. Mean \pm sd (range).

Character	FLO	MXA	BAU	IND	BAC	AMA
	Nguyen et al. 2006	Nguyen et al. 2004	Phan et al. 2003	Poinar 1992	Poinar 1990	Present study
n	20	20	14	12	15	20
L	862 \pm 44 (785-924)	686 \pm 38 (614 - 801)	889 \pm 45 (818-970)	721 \pm 64 (573-788)	820 (780-960)	752 \pm 43 (692-826)
D	47.6 \pm 2.2 (43-50)	42 \pm 3 (38 - 47)	49 \pm 2 (43-53)	42 \pm 7 (35-46)	43 (38-46)	41 \pm 2.3 (36-43)
EP	117 \pm 6 (104-128)	124 \pm 10 (108 - 145)	81 \pm 7 (71-93)	123 \pm 7 109-138)	121 (114-130)	109 \pm 6 (96-116)
NR	80 \pm 5 (73-90)	71 \pm 6 (61 - 83)	65 \pm 7 (54-77)	75 \pm 4 (72-85)	72 (65-81)	79 \pm 5 (71-88)
ES	105 \pm 4 (97-111)	96 \pm 5 (89 - 108)	116 \pm 10 (105-132)	101 \pm 4 (93-109)	103 (99-105)	105 \pm 5 (97-114)
T	34 \pm 5.8 (29-40)	27 \pm 4 (21 - 36)	33 \pm 3 (28-38)	28 \pm 2 (24-32)	28 (22-36)	33 \pm 2.7 (29-41)
ABD	26.3 \pm 3 (20-31)	24 \pm 1.3 (23 - 27)	22 \pm 1 (20-24)	23 \pm 8 (19-24)	23 (22-25)	27 \pm 2.6 (23-33)
SP	42 \pm 3.5 (36-46)	41 \pm 3.8 (30 - 47)	40 \pm 3 (33-45)	43 \pm 3 (35-48)	40 (36-44)	41 \pm 2.9 (35-45)
GU	23 \pm 3.7 (17-30)	23 \pm 3 (18 - 32)	20 \pm 1.5 (18-22)	21 \pm 3 (18-23)	20 (18-25)	21 \pm 1.5 (19-23)
D%	112 \pm 4 (105-119)	129 \pm 9 (114 - 149)	70 -	122 -	117 -	103 \pm 3.7 (95-109)
SW%	157 \pm 25 (133-209)	167 \pm 2 (130 - 196)	182 \pm 18 (138-208)	187 -	174 -	152 \pm 20 (120-187)
GS%	53,8 (47-65)	56 \pm 7 (43 - 70)	50 \pm 5 (44-61)	50 \pm 10 (40-60)	50 -	51 \pm 3.2 (44-56)

n = number of specimens measured; EP = distance from anterior end to excretory pore; NR = distance from anterior end to nerve ring; ES = distance from anterior end to end of pharynx; D = greatest body diameter; ABD = anal body diameter; T = tail length; SP = spicule length; GU = gubernaculum length; D% = EP/ES \times 100; SW% = SP/ABD \times 100; GS% = GU/SP \times 100.

FLO = *H. floridensis*; MXA = *H. mexicana*; BAU = *H. baujardi*; IND = *H. indica*; BAC = *H. bacteriophora*; AMA = *H. amazonensis*.

Table 3. Comparative morphometrics (μm) of infective juveniles of *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. and other species. Mean \pm sd (range).

Character	FLO	MXA	BAU	IND	BAC	AMA
	Nguyen et al. 2006	Nguyen et al. 2004	Phan et al. 2003	Poinar 1992	Poinar 1990	Present study
n	25	25	25	25	25	20
L	562 \pm 24 (554-609)	578 \pm 23 (530 - 620)	551 \pm 27 (497-595)	528 \pm 26 (479-573)	558 (512-671)	589 \pm 12 (567-612)
D	21.2 \pm 4.6 (19-23)	23 \pm 0.8 (20 - 24)	20 \pm 2 (18-22)	20 \pm 6 (19-22)	23 (18-31)	23 \pm 1.2 (20-24)
EP	109 \pm 10.4 (101-122)	102 \pm 5.2 (83-109)	97 \pm 3 (91-103)	98 \pm 7 (88-107)	103 (87-110)	107 \pm 6.1 (89-115)
NR	86 \pm 9.2 (68-107)	81 \pm 4.2 (74 - 88)	81 \pm 3 (75-86)	82 \pm 4 (72-85)	85 (72-93)	85 \pm 4.9 (76-93)
ES	135 \pm 11.6 (123-142)	122 \pm 27 (104-142)	115 \pm 3 (107-120)	117 \pm 3 (109-123)	125 (10-13)	121 \pm 6.6 (107-132)
T	103 \pm 10.1 (91-113)	99 \pm 4.2 (91-106)	90 \pm 4 (83-97)	101 \pm 6 (93-109)	98 (83-112)	107 \pm 4.7 (98-115)
T'	63 \pm 7.9 (48-68)	66 \pm 3 (59-73)	- -	- -	- -	69 \pm 4.4 (59-74)
ABD	14 \pm 3.7 (12-16)	15 \pm 1.2 (12-17)	13 \pm 0.7 (11-14)	- -	- -	14 \pm 1.4 (13-17)
a = L/D	27.6 \pm 5.2 (25-32)	25,8 (23.6-28.4)	28 \pm 1 (26-30)	26 \pm 4 (25-27)	25 (17-30)	26 \pm 1.3 (24-29)
b = L/ES	4.3 \pm 2.1 (3.9-4.9)	4,6 (4.2-5.1)	4.8 \pm 0.2 (4.5-5.1)	4.5 \pm 0.34 (4.3-4.8)	4,5 (4-5.1)	4.9 \pm 0.3 (4.4-5.5)
c = L/T	5.6 \pm 2.4 (5.3-6.6)	5,9 (5.5-6.3)	6 \pm 0.3 (6-6.7)	5.3 \pm 0.5 (4.5-5.6)	6,2 (5.7-7)	5.5 \pm 0.2 (5.1-6.1)
D%	81 \pm 8.9 (71-90)	81 \pm 3 (72-86)	84 \pm 3 (78-88)	84 \pm 5 (79-90)	84 (76-92)	88 \pm 2.7 (83-92)
E%	105 \pm 10.2 (95-134)	104 \pm 5.2 (87-111)	108 \pm 4 (98-114)	94 \pm 7 (83-103)	112 (103-130)	100 \pm 6.0 (89-109)

n = number of specimens measured; EP = distance from anterior end to excretory pore; NR = distance from anterior end to nerve ring; ES = distance from anterior end to end of pharynx; D = greatest body diameter; ABD = anal body diameter; T = tail length with sheath; T' = tail length without sheath; D% = EP/ES \times 100; E% = EP/T \times 100.

FLO = *H. floridensis*; MXA = *Heterorhabditis mexicana*; BAU = *H. baujardi*; IND = *H. indica*, BAC = *H. bacteriophora*; AMA = *H. amazonensis*.

Table 4. Sequence length (base pairs = bp) and composition of ITS region and ten species of *Heterorhabditis*.

Species (Seq length)	ITS1 (bp)	5.8S (bp)	ITS2 (bp)	A	C	G	T
<i>H. amazonensis</i> n. sp. (1010 bp)	395	154	211	0.25941	0.20198	0.25545	0.28317
<i>H. bacteriophora</i> (1021 bp)	389	154	228	0.26347	0.1998	0.25661	0.28012
<i>H. baujardi</i> (795 bp) ¹⁾	?	154	211	0.25732	0.19677	0.25089	0.29502
<i>H. downesi</i> (990 bp)	374	154	212	0.23838	0.21717	0.26162	0.28283
<i>H. floridensis</i> (1012 bp)	393	154	214	0.25988	0.20059	0.25494	0.28458
<i>H. indica</i> (988 bp)	370	154	215	0.26316	0.20547	0.25506	0.27632
<i>H. marelatus</i> (995 bp)	379	154	211	0.23417	0.21608	0.26432	0.28543
<i>H. megidis</i> (1005 bp)	384	154	220	0.23284	0.2199	0.27164	0.27562
<i>H. mexicana</i> (1010 bp)	394	154	213	0.25545	0.20198	0.2604	0.28218
<i>H. zealandica</i> (1003 bp)	387	154	212	0.22233	0.21834	0.27318	0.28614

¹⁾ This sequence is not as complete as in other species.

? Not available.

Table 5. Pairwise distances between taxa. Below diagonal: total character differences; above diagonal: mean character differences (adjusted for missing data).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 <i>H. amazonensis</i> n. sp.	-	0.0685	0.0218	0.0189	0.1885	0.1595	0.1737	0.1606	0.1692	0.0198	0.4404	0.3102
2 <i>H. indica</i>	67	-	0.0785	0.0946	0.1835	0.1549	0.1714	0.1564	0.1532	0.0795	0.4288	0.3137
3 <i>H. mexicana</i>	22	77	-	0.0303	0.1965	0.1677	0.1787	0.1687	0.1772	0.0158	0.4379	0.3185
4 <i>H. baujardi</i>	15	72	24	-	0.2358	0.2058	0.2225	0.2055	0.2150	0.0240	0.4896	0.4000
5 <i>H. zealandica</i>	184	176	192	179	-	0.0761	0.0995	0.0859	0.1592	0.1973	0.4226	0.3565
6 <i>H. downesi</i>	154	148	162	154	75	-	0.0395	0.0374	0.1259	0.1696	0.4134	0.3230
7 <i>H. megidis</i>	168	163	173	168	98	39	-	0.0589	0.1405	0.1806	0.4243	0.3314
8 <i>H. marelatus</i>	156	150	164	155	85	37	58	-	0.1251	0.1706	0.4159	0.3243
9 <i>H. bacteriophora</i>	165	147	173	163	157	123	137	123	-	0.1791	0.4321	0.3178
10 <i>H. floridensis</i>	20	78	16	19	193	164	175	166	175	-	0.4415	0.3146
11 <i>C. elegans</i>	436	416	434	380	415	401	418	406	430	438	-	0.4343
12 <i>P. typica</i>	161	160	165	144	184	167	172	168	164	163	235	-

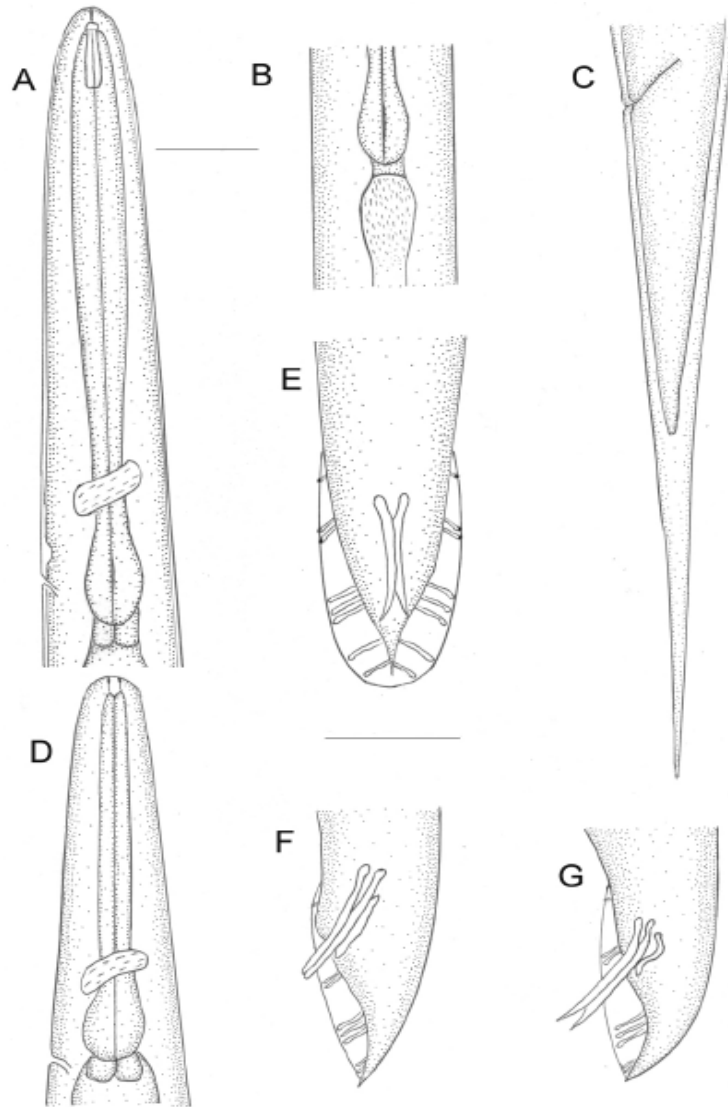


Fig. 1. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. A-C: Infective juveniles. A: Anterior region; B: Basal bulb region; C: Posterior region. D-G: Males. D: Anterior region; E: Posterior region, ventral view; F, G: Variation of tail and gubernacula. Scales: A-C = 14 μ m, D-G = 41 μ m.

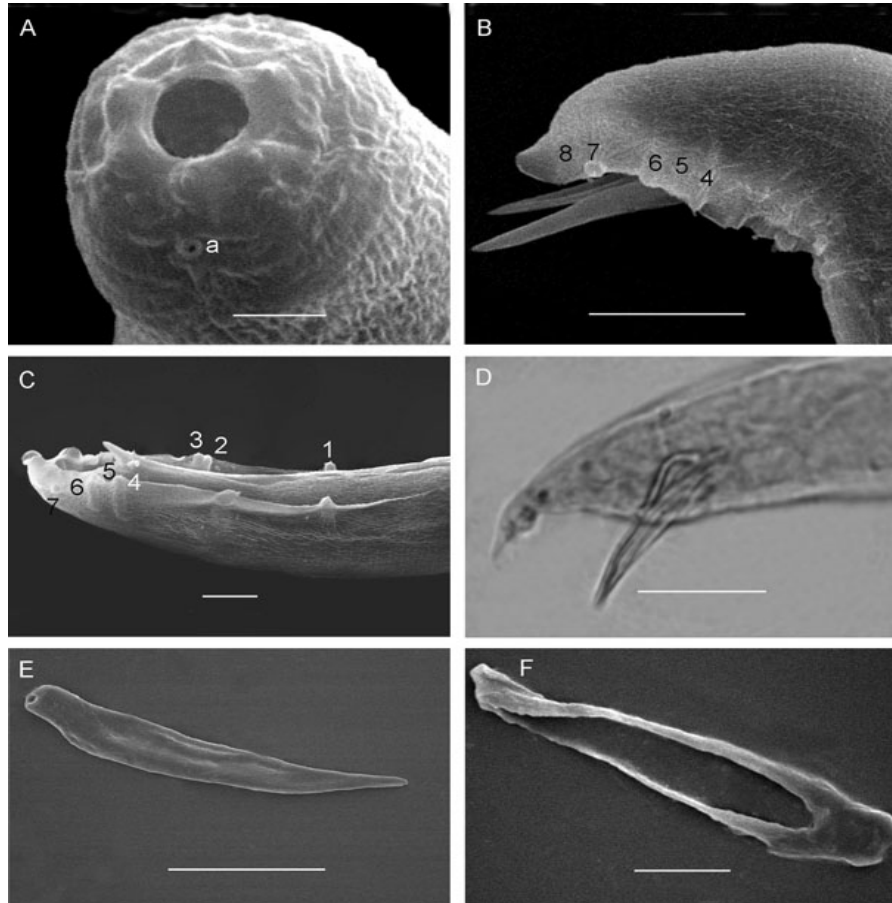


Fig. 2. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. A-C, E, F: SEM photographs of male. A: Head region showing mouth opening, six labial papillae and an amphidial aperture (a); B: Posterior region showing protruding spicules and bursa with papillae 4-8; C: Posterior region showing bursa with papillae 1-7, note that papilla 4 does not curve laterally; E: Spicule; F: Gubernaculum. D: Light microscope photograph of posterior region showing a well curved gubernaculum. Scale bars: A = 2.4 μm ; B = 16.8 μm , C = 10 μm ; D = 25.8 μm ; E = 16.8 μm ; F = 4.3 μm .

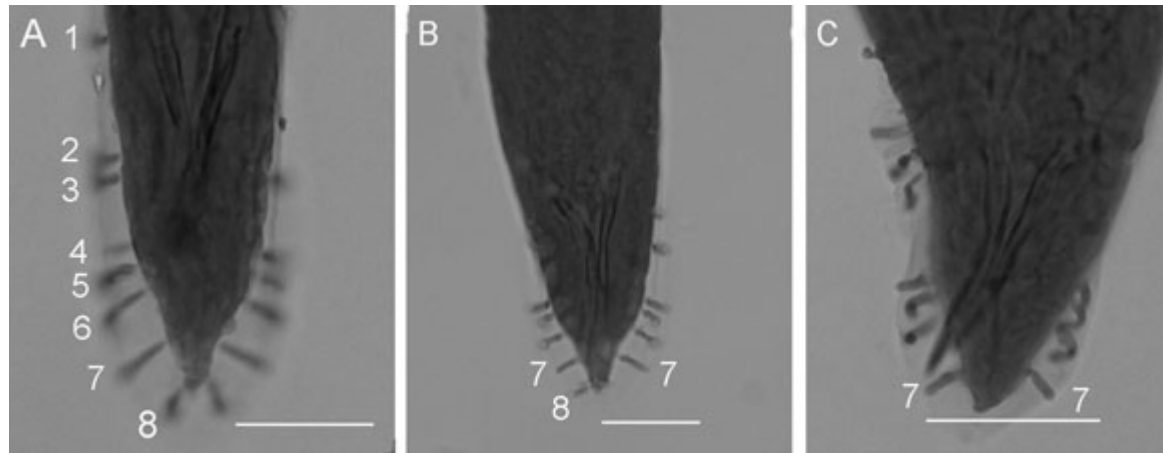


Fig. 3. *Heterorhabditis amazonensis n. sp.* Male tails with bursal papillae. *A:* Bursa with two pairs of bursal papillae in terminal group; *B:* Bursa with two pairs of bursal papillae on one side and one papilla on the other side in terminal group; *C:* Bursa with one pair of bursal papillae in terminal group. Scale bars: *A* = 28.7 μm ; *B* = 27 μm ; *C* = 31.3 μm .

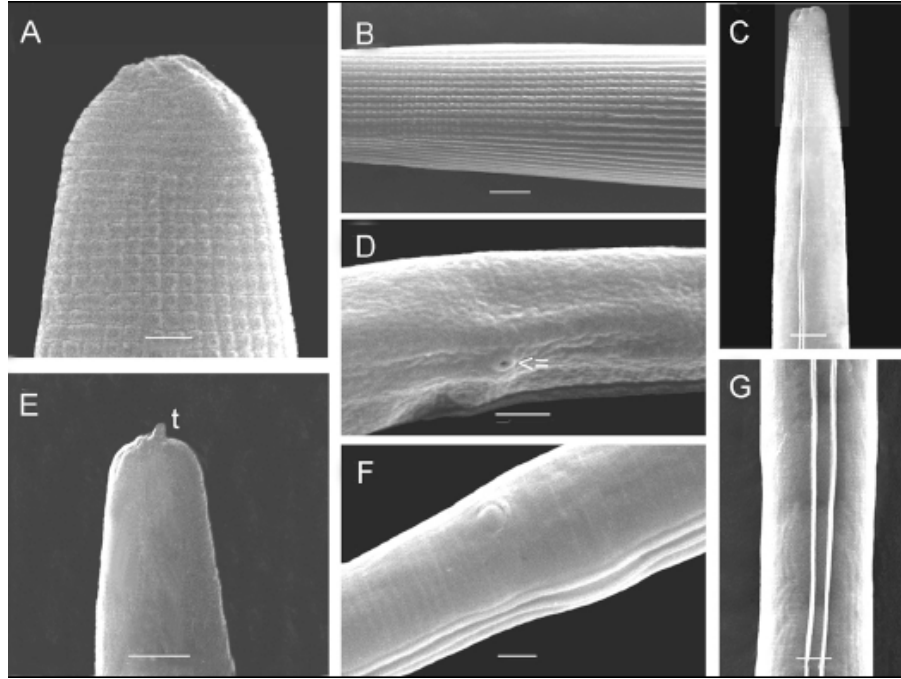


Fig. 4. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. SEM photographs of infective juveniles. A: Anterior region of an ensheathed infective juvenile (IJ) showing the head with seven annules and the body with tessellate pattern; B: A portion of body showing tessellate pattern and longitudinal ridges; C: Anterior region of an exsheathed IJ showing lateral field in the anterior region with one ridge, then changing to two ridges; D: Phasmid near mid-tail of an infective juvenile (arrow); E: Anterior region of an exsheathed IJ showing dorsal tooth (t); F: Lateral field and anus in posterior region; G: Lateral field at mid-body with two ridges. Scale bars: A, B, C, E, G = 4 μ m; D, F = 2 μ m.

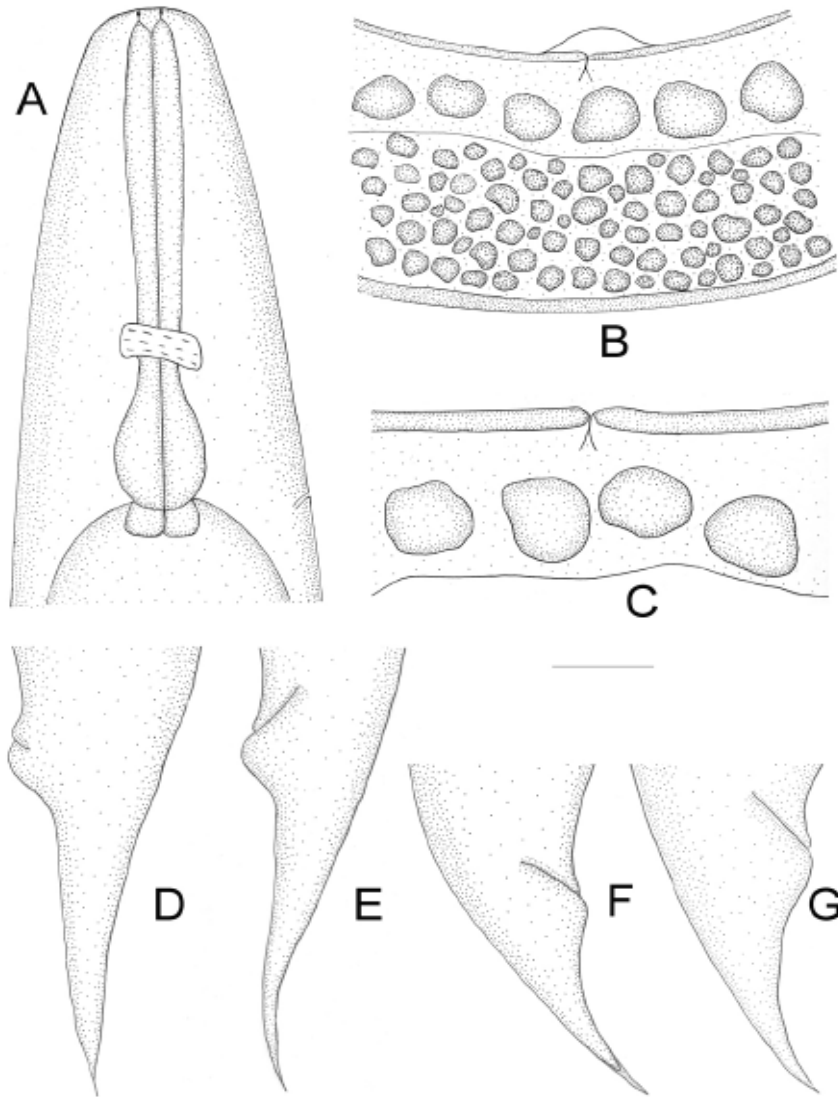


Fig. 5. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. females. A: Anterior region; B: Vulval region of an amphimictic female showing exudates covering vulva; C: Vulval region of a hermaphroditic female; D, E: Variation of tails of hermaphroditic females; F, G: Variation of tails of amphimictic females. Scale: A-G = 25 μ m.

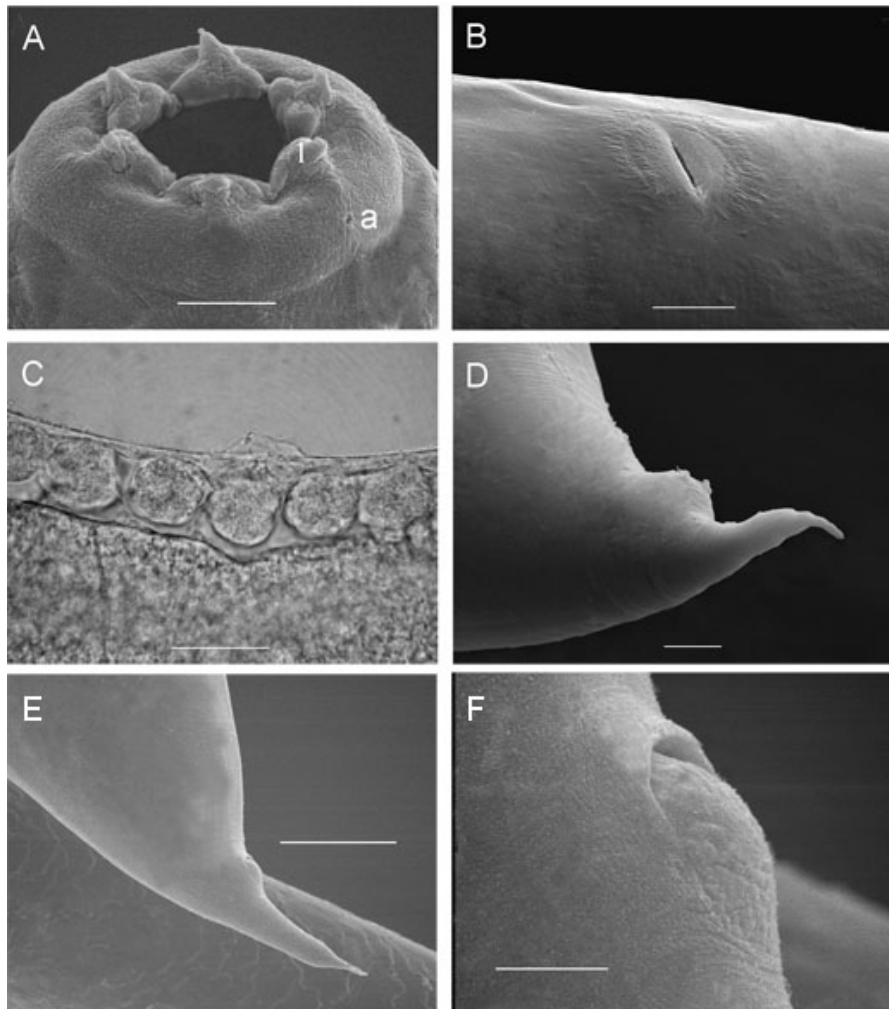


Fig. 6. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. *A, B and D:* SEM photographs of hermaphroditic females. *A:* Anterior region showing six prominent lips (*l*), six labial papillae, and an amphidial aperture (*a*); *B:* Vulva showing elliptical pattern; *D:* Tail showing postanal swelling with two papilla-like structures; *C:* Light microscope photograph of vulva of an amphimictic female covered with exudates or copulation plug after mating; *E:* Another form of tail of hermaphroditic female; *F:* Anus of a hermaphroditic female. Scale bars: *A* = 8.6 μm ; *B* = 20 μm ; *C* = 23 μm ; *D* = 10 μm ; *E* = 93 μm ; *F* = 4.9 μm .

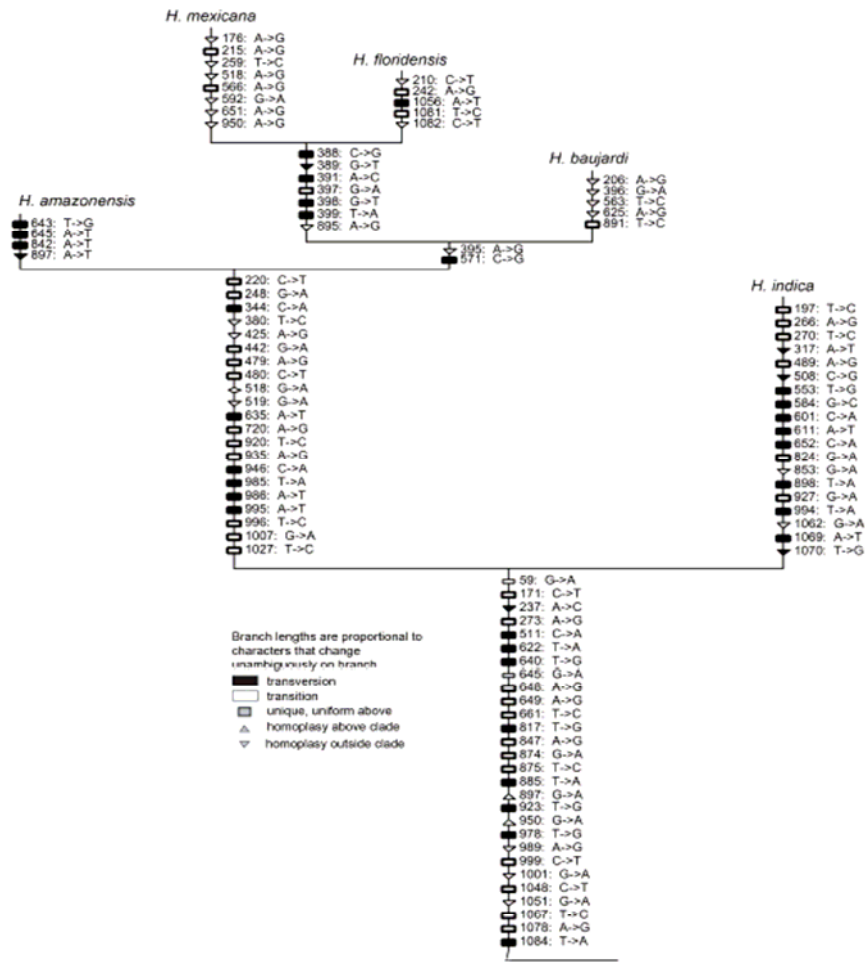


Fig. 7. Clade containing *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. and nearest neighbors in the “indica group” (*H. amazonensis* n. sp., *H. baujardi*, *H. florldensis*, *H. indica*, *H. mexicana*). Phylogeny reconstructed from ITS rDNA sequences (maximum parsimony and maximum likelihood solutions were congruent). Mapped character states (unambiguous changes only; McClade 4.05) identify character support and autapomorphies (= unique, derived characters; rectangular boxes at the positions 643, 645 and 842 of the transformation series), all of them are transversions.

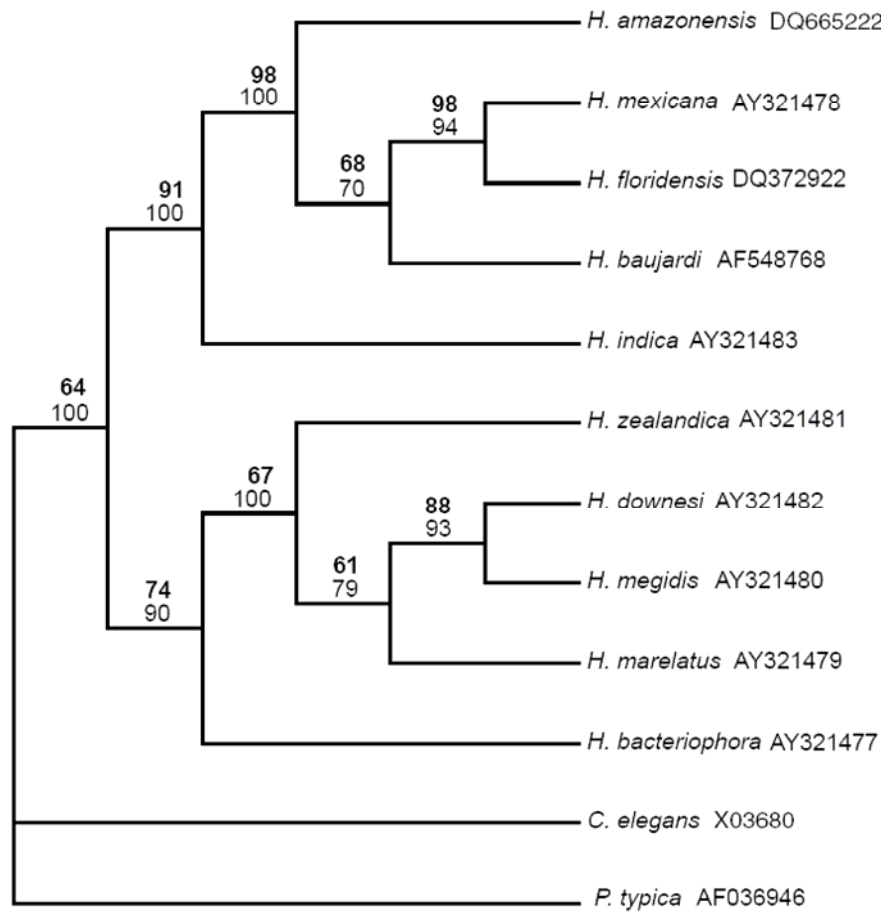


Fig. 8. Phylogenetic relationships of ten species of *Heterorhabditis* based on analyses of ITS rDNA regions. Maximum parsimony and maximum likelihood analyses produced identical trees. Bootstrap support indices for maximum parsimony (1000 replicates) are in regular font and maximum likelihood (100 replicates) indices are in bold.

ARTIGO 2

Efeito da temperatura e da concentração na sobrevivência de nematóides
entomopatogênicos durante o armazenamento

(Preparado de acordo com as normas da revista “Boletín de Sanidad
Vegetal de Plagas”. Publicado: v. 31, n. 2, p. 253-265, 2005)

VANESSA ANDALÓ¹

ALCIDES MOINO JR¹

JUAN PABLO MOLINA ACEVEDO²

RICARDO SOUSA CAVALCANTI¹

FLAVIANE ANGÉLICA DE CARVALHO¹

¹Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG.

²CCTA/LPP (UENF), Av. Alberto Lamego 2000, CEP 28015-620, Campos dos Goytacazes, RJ.

Effect of temperature and concentration in the survival of entomopathogenic
nematodes under storage conditions

ABSTRACT

The temperature and concentration of infective juveniles can influence the storage of entomopathogenic nematodes (EPN). In this study, the objective was to evaluate the influence of temperature and concentration on EPN survival conditions. The survival and infectivity of *Steinernema carpocapsae*, *S. riobrave*, *Heterorhabditis* sp. CCA and *Heterorhabditis* sp. JPM4, in concentrations of 100, 1.000, 5.000 and 10.000 IJ/mL at 8, 12, 16, 20, 24 and 28°C was evaluated. The observations were made at 15, 30, 60, 120, 150 and 180 days of storage. It was observed that both *Heterorhabditis* sp. CCA as *Heterorhabditis* sp. JPM4 had reduced survival at 8, 12, 24 and 28°C. Also *S. carpocapsae* and *S. riobrave* presented reduced survival starting first at 60 days at 24 and 28°C and also had reduction infectivity after 60 days at 24 and 28°C. *Heterorhabditis* sp. CCA and *Heterorhabditis* sp. JPM4 showed reduced infectivity at 15 days at 8°C and 60 days at 24 and 28°C. The differences in survival support the importance of study favorable factors for the maintenance of the characteristics in different conditions, in order to prolong the time of EPN survival and infectivity.

Keywords: Heterorhabditidae, Steinernematidae, biological control, infectivity, survival.

RESUMEN

Factores como la temperatura y concentración de juveniles infectantes (JI), pueden influenciar el almacenamiento de nematodos entomopatógenos (NEP). Este ensayo tuvo por objetivo evaluar la influencia de la temperatura y concentración de JI en su supervivencia, a fin de mejorar el almacenamiento, obteniendodo JIs más virulentos. Fueron evaluados viabilidad e infectividad de *Steinernema carpocapsae*, *S. riobrave*, *Heterorhabditis* sp. CCA e *Heterorhabditis* sp. JPM 4, en concentraciones de 100, 1.000, 5.000 e 10.000 JI/mL en 8, 12, 16, 20, 24 e 28°C. Las evaluaciones fueron hechas a los 15, 30, 60, 120, 150 y 180 días. Se observó que tanto *Heterorhabditis* sp. CCA como *Heterorhabditis* sp. JPM4 presentaron viabilidad reducida en 8, 12, 24 e 28°C. *Steinernema carpocapsae* y *S. riobrave* presentaron reducción en su viabilidad a partir de 60 días de almacenamiento a 24 e 28°C. *Heterorhabditis* sp. CCA e *Heterorhabditis* sp. JPM4 presentaron reducción en su infectividad a partir de 15 días para 8°C y a partir de 60 días a 24 e 28°C. Tanto *S. carpocapsae* como *S. riobrave* presentaron reducción en infectividad a partir de 60 días a 24 e 28°C. Las diferencias evidenciaron la importancia del estudio de factores que favorecan la manutencion de las características de NEP en diferentes condiciones, a fin de prolongar el tiempo de supervivencia e infectividad.

Palabras clave: Heterorhabditidae, Steinernematidae, control biológico, infectividad, supervivencia.

RESUMO

Fatores como temperatura e concentração de juvenis infectantes podem influenciar no armazenamento de nematóides entomopatogênicos. Neste estudo, o objetivo foi avaliar a influência da temperatura e concentração na sobrevivência desses nematóides a fim de melhorar o armazenamento, obtendo-se juvenis infectantes mais virulentos. Foram avaliadas variáveis como viabilidade e infectividade de *Steinernema carpocapsae*, *S. riobrave*, *Heterorhabditis* sp. CCA e *Heterorhabditis* sp. JPM4 nas concentrações de 100, 1.000, 5.000 e 10.000 JI/mL, em 8, 12, 16, 20, 24 e 28°C. As avaliações foram feitas aos 15, 30, 60, 120, 150 e 180 dias de armazenamento. Observou-se que tanto *Heterorhabditis* sp. CCA como *Heterorhabditis* sp. JPM4 tiveram viabilidade reduzida em 8, 12, 24 e 28°C. Também *S. carpocapsae* e *S. riobrave* apresentaram redução de viabilidade a partir de 60 dias a 24 e 28°C. *Heterorhabditis* sp. CCA e *Heterorhabditis* sp. JPM4 tiveram redução de infectividade a partir de 15 dias para 8°C e a partir dos 60 dias para 24 e 28°C. Tanto *S. carpocapsae* como *S. riobrave* tiveram redução de infectividade a partir de 60 dias a 24 e 28°C. As diferenças encontradas entre nematóides evidenciam a importância de se conhecerem os fatores favoráveis quanto às condições de armazenamento, melhorando o tempo de sobrevivência e infectividade.

Palavras-chave: Heterorhabditidae, Steinernematidae, controle biológico, infectividade, sobrevivência.

INTRODUÇÃO

Os nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) têm sido estudados nos sistemas agrícolas para controle de insetos praga, com variações no grau de sucesso e com alta potencialidade para controle de pragas do solo e de hábitos crípticos (Molina & López, 2003). Os nematóides no terceiro estágio, juvenil infectante (JI), podem viver livremente, procurando no solo um hospedeiro suscetível. Durante esse estágio os nematóides não se alimentam nem se desenvolvem. Uma vez penetrando em um inseto hospedeiro, liberam sua bactéria simbiote, a qual, em combinação com toxinas produzidas pelos nematóides, mata o hospedeiro em dois ou três dias. As bactérias e tecidos degradados do hospedeiro fornecem fontes de nutrientes para o desenvolvimento dos nematóides. Esses geralmente passam duas gerações dentro do hospedeiro em um período de dez dias, dependendo da temperatura e da densidade inicial de inóculo (Adams & Nguyen, 2002).

As estratégias usadas pelos nematóides entomopatogênicos para sobreviver em condições adversas (dessecação, anidrobiose, congelamento, radiação ultravioleta, doenças e predação) são pouco conhecidas, podendo estar relacionadas com a permanência do nematóide no solo em estado quiescente; a migração, evitando as condições adversas; e a permanência no cadáver dos insetos por períodos extensos (Glazer, 2002). De acordo com Molina & López

(2003), uma baixa umidade favorece processos de anidrobiose, o que incide negativamente na infectividade dos nematóides entomopatogênicos. Assim mesmo, é necessário estudar os parâmetros que influenciam um curto ou longo período de persistência dos nematóides, aspecto importante para sua liberação no campo em programas de controle biológico, para garantir a sobrevivência dos juvenis infectantes no meio ambiente (Brown & Gaugler, 1997).

A sobrevivência desses nematóides tem sido muito discutida, sendo que em condições de laboratório ocorre alta mortalidade em pouco tempo de armazenamento. A temperatura é um importante fator, que influencia tanto na sobrevivência de nematóides como na mobilidade e infectividade. Extremos de temperatura alta e baixa são fatores que limitam a sobrevivência desses organismos (Glazer, 2002); porém, pouco é conhecido sobre a ecologia de sobrevivência dos nematóides entomopatogênicos.

A baixa temperatura pode facilitar a sobrevivência pelo abaixamento no número de nematóides produzidos por cadáver, diminuindo as taxas metabólicas das bactérias e a demanda por oxigênio, sugerindo que a sobrevivência pode estar associada, em parte, à densidade (concentração) (Brown & Gaugler, 1997).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da temperatura e da concentração na sobrevivência de JI de nematóides entomopatogênicos, a fim de melhorar as condições de armazenamento desses organismos, mantendo alta a sua viabilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Manutenção e multiplicação dos nematóides entomopatogênicos

A produção dos nematóides foi realizada no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil. Os nematóides foram mantidos em frascos Erlenmeyer em geladeira com temperatura de 8 a 10°C, em suspensão aquosa com 500 juvenis infectantes/mL (JI/mL).

Para a multiplicação foram usadas lagartas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) criadas no Laboratório de Patologia de Insetos de acordo com Dutky et al. (1964), utilizando-se dieta artificial modificada por Parra (1998).

Cinco destas lagartas, de tamanho semelhante, foram selecionadas e posteriormente colocadas em uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro com uma folha de papel filtro no fundo, em que foi inoculado 1 mL da suspensão com os nematóides, com concentração de 20 ± 5 JI por lagarta. As placas foram mantidas em câmara BOD por 2 a 3 dias até a morte das lagartas. As lagartas mortas foram retiradas e colocadas em placas de Petri de 9 cm com papel filtro seco por 4 dias (Molina & López, 2001).

Após esta fase foi montada a armadilha modificada de White (White, 1927), na qual foram colocadas cinco lagartas mortas por nematóides e cerca de

3 mL de água no fundo da placa. As armadilhas foram colocadas em BOD por um período de 3 a 7 dias. A suspensão recolhida foi filtrada e decantada para retirar corpos gordurosos do inseto. Para a filtragem foi usado um funil, uma proveta e uma peneira de 150 mesh, com abertura de furo de 0,106 mm. Na proveta foram adicionados 750 mL de água destilada mais espalhante adesivo Tween 80[®] a 0,1%. A suspensão de nematóides foi filtrada, deixando decantar por 1 dia. Após o processo de purificação dos nematóides, realizou-se a quantificação da suspensão em placas de poliestireno para testes serológicos. As diluições para armazenamento foram feitas até cerca de 500 JI/mL, os quais foram armazenados em geladeira ($8 \pm 2^{\circ}\text{C}$) para, posteriormente, serem utilizados nos bioensaios.

Bioensaios para avaliação da temperatura e concentração de juvenis infectantes de nematóides entomopatogênicos no armazenamento

Os nematóides utilizados foram *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding, 1982, *S. riobrave* Cabanillas, Poinar e Raulston, 1994, *Heterorhabditis* sp. CCA (isolado nativo da região de Araras-SP, Brasil) e *Heterorhabditis* sp. JPM4 (isolado nativo da região de Lavras-MG, Brasil), provenientes do banco de microrganismos entomopatogênicos do Laboratório de Patologia dos Insetos do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

Suspensões desses nematóides foram preparadas nas concentrações de 100, 1.000, 5.000 e 10.000 JI/mL. Depois de preparadas, as suspensões foram individualizadas em copos plásticos de 110 mL com tampa, de acordo com os tratamentos e as repetições, colocando-se 50 mL de suspensão em cada repetição. As tampas foram perfuradas, deixando um orifício de aproximadamente 2 cm de diâmetro para possibilitar aeração.

Essas suspensões foram submetidas às temperaturas de 8, 12, 16, 20, 24 e 28°C, em câmara climatizada com escotofase de 24 horas, e 10 repetições para cada tratamento. As avaliações foram feitas aos 15, 30, 60, 120, 150 e 180 dias após o armazenamento, sendo avaliados os parâmetros viabilidade e infectividade. Para o teste de viabilidade foi contado o número de nematóides vivos e mortos. Para isso, uma alíquota de 0,1 mL da suspensão, de cada repetição, foi colocada em placa de poliestireno para testes serológicos e a contagem, realizada com auxílio de um microscópio estereoscópico.

No teste de patogenicidade, uma lagarta de *G. mellonella* foi colocada em uma placa de Petri de 5 cm com papel filtro no fundo. Uma alíquota de 0,2 mL de cada suspensão foi retirada e aplicada na lagarta. Estas placas foram colocadas em câmara climatizada a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e, após 3 dias, foi avaliada a porcentagem de mortalidade das lagartas.

Determinação da viabilidade e infectividade de nematóides entomopatogênicos em armazenamento

Considerando a proporção de nematóides obtidos por meio da razão entre o número de nematóides vivos e número total de nematóides, ajustaram-se os modelos para os quatro nematóides. Para isso utilizou-se π_{ijk} , indicando a proporção de nematóides mortos submetidos à concentração (C_i) ($i=100, 1000, 5000$ e 10000); temperatura (T_{e_j}) ($j=8, 12, 16, 20, 24$ e 28); tempo (X_k) ($k=15, 30, 60, 120, 150$); e y_{ijk} , correspondente ao número de nematóides mortos na concentração (i), temperatura (j) e tempo (k) e m definido como total de nematóides. O preditor linear μ_{ijk} foi obtido por meio da função definida como:

$$\text{Logit } \pi_{ijk} = \ln \left(\frac{\pi_{ijk}}{1 - \pi_{ijk}} \right) = \varepsilon \left(\frac{y_{ijk}}{m} \right) = \mu_{ijk}, \text{ em que} \quad (1)$$

$$\mu_{ijk} = \beta_0 + C_i + T_{e_j} + C_i X + T_{e_j} X + C_i X^2 + T_{e_j} X^2 \quad (2)$$

A proporção de nematóides mortos foi estimada pela combinação linear:

$$p = \frac{e^{\mu_{ijk}}}{1 + e^{\mu_{ijk}}} \quad (3)$$

Para o parâmetro infectividade, em virtude da variável de interesse ser caracterizada por apenas dois valores, lagarta viva ou morta, procedeu-se, por meio do cálculo de porcentagem de mortalidade das lagartas, à análise estatística por um modelo de regressão logística.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Viabilidade de juvenis infectantes de nematóides entomopatogênicos em armazenamento

Pode-se inferir que os modelos propostos foram adequados para prever a proporção de nematóides vivos. Esse fato é confirmado pelo valor da deviance estar próximo ao grau de liberdade. Essa proximidade é interpretada pela razão (Deviance/GL) (Tabela 1).

Os dados obtidos na avaliação de viabilidade dos nematóides após 180 dias em armazenamento não se adequaram ao modelo proposto; desta forma, foi feita análise descritiva dos resultados.

Tabela 1. Análise da qualidade do ajuste dos modelos por meio da deviance.

Nematóide	GL	Deviance	(Deviance/GL)
<i>Heterorhabditis</i> sp. CCA	1173	1069,4078	0,9117
<i>Heterorhabditis</i> sp. JPM4	1173	1129,0379	0,9625
<i>Steinernema riobrave</i>	1173	874,4536	0,7455
<i>Steinernema carpocapsae</i>	1173	875,1627	0,7461

Os nematóides *Heterorhabditis* sp. CCA e *Heterorhabditis* sp. JPM4 não apresentaram redução de viabilidade enquanto armazenados por até 15 dias nas diferentes temperaturas testadas. Após 30 dias, *Heterorhabditis* sp. JPM4

teve redução acentuada de viabilidade na temperatura de 8°C; porém, a partir de 60 dias essa redução ocorreu também para as temperaturas de 12, 24 e 28°C. Decorridos 120 dias, não foram encontrados nematóides viáveis nas temperaturas de 8 e 28°C, sendo também observado decréscimo na viabilidade para as temperaturas de 12 e 24°C, nas avaliações subseqüentes de 150 e 180 dias. Dessa forma, as temperaturas de 16 e 20°C foram consideradas mais adequadas para armazenamento desses nematóides em suspensão aquosa. As diferentes concentrações testadas (100, 1.000, 5.000 e 10.000 JI/mL) proporcionam resultados semelhantes, não diferindo entre si em relação à viabilidade dos nematóides *Heterorhabditis* sp. CCA e *Heterorhabditis* sp. JPM4 (Tabela 2; Figuras 1 e 2).

Para *S. riobrave* e *S. carpocapsae* observou-se a manutenção da viabilidade até 60 dias de armazenamento, sendo que após esse período houve um decréscimo principalmente para temperaturas de 24 e 28°C. Essa redução foi se acentuando a cada avaliação para essas temperaturas, até que com 150 dias não foram encontrados nematóides viáveis na temperatura de 28°C e após 180 dias esse resultado também foi observado para a temperatura de 24°C. Assim, as temperaturas de 8, 12, 16 e 20°C foram consideradas preferenciais para armazenamento de *S. riobrave* e *S. carpocapsae* em suspensão aquosa. Em relação às concentrações avaliadas não foram observadas diferenças para esses nematóides quanto à perda de viabilidade (Tabela 2; Figuras 3 e 4).

Tabela 2. Tratamentos utilizados para avaliação da viabilidade de juvenis infectantes dos nematóides entomopatogênicos após 180 dias de armazenamento (Figuras 1 a 4).

Tratamento*	Temperatura (°C)	Concentração (JI/mL)
H/J/R/F 1	8	100
H/J/R/F 2	8	1.000
H/J/R/F 3	8	5.000
H/J/R/F 4	8	10.000
H/J/R/F 5	12	100
H/J/R/F 6	12	1.000
H/J/R/F 7	12	5.000
H/J/R/F 8	12	10.000
H/J/R/F 9	16	100
H/J/R/F 10	16	1.000
H/J/R/F 11	16	5.000
H/J/R/F 12	16	10.000
H/J/R/F 13	20	100
H/J/R/F 14	20	1.000
H/J/R/F 15	20	5.000
H/J/R/F 16	20	10.000
H/J/R/F 17	24	100
H/J/R/F 18	24	1.000
H/J/R/F 19	24	5.000
H/J/R/F 20	24	10.000
H/J/R/F 21	28	100
H/J/R/F 22	28	1.000
H/J/R/F 23	28	5.000
H/J/R/F 24	28	10.000

*H = *Heterorhabditis* sp. CCA; J = *Heterorhabditis* sp. JPM4; R = *Steinernema riobrave*; F = *Steinernema carpocapsae*.

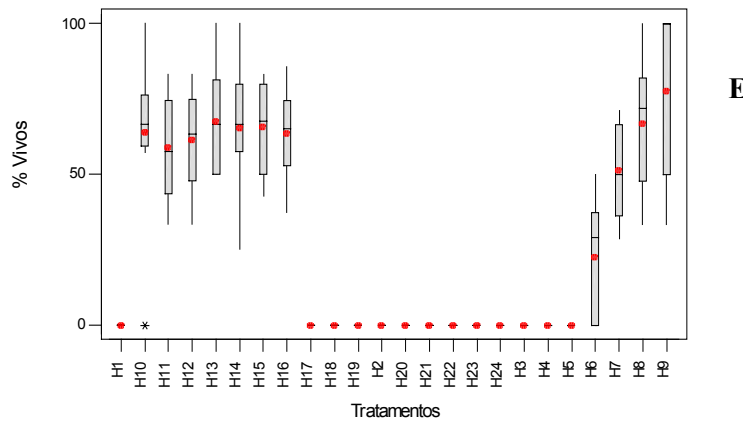
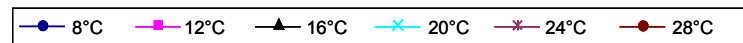
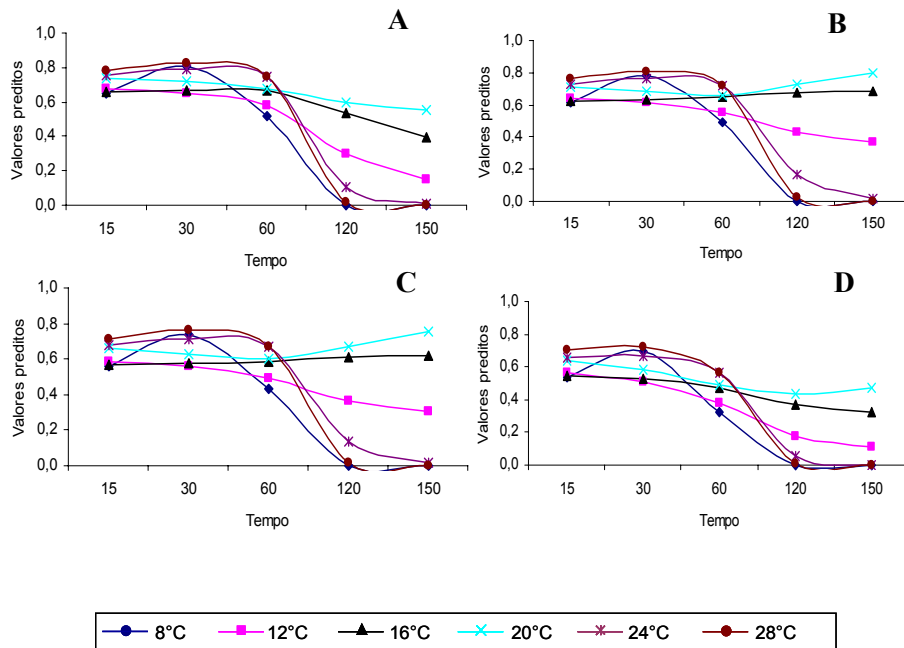


Figura 1. Viabilidade de *Heterorhabditis* sp. CCA. A. 100 JI/mL; B. 1.000JI/mL; C. 5.000 JI/mL; D. 10.000 JI/mL; E. 180 dias.

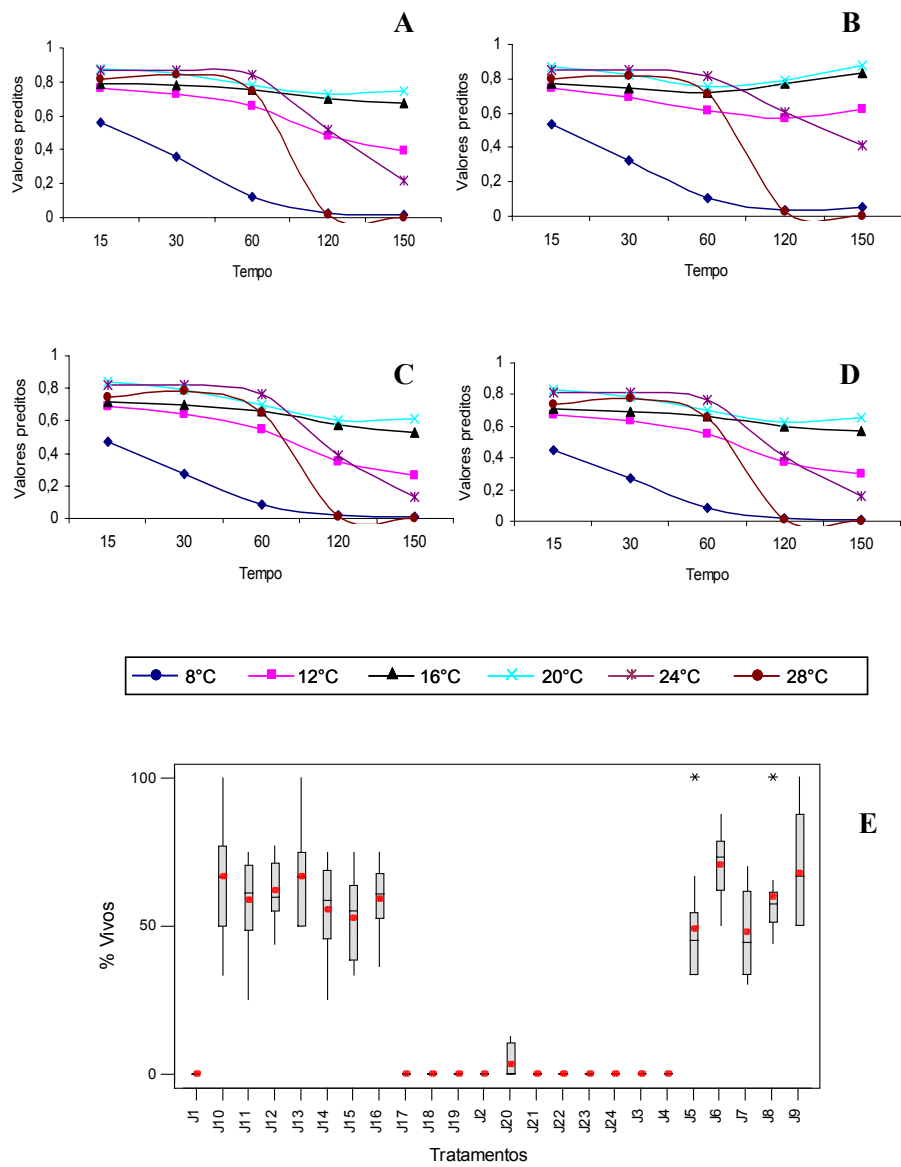


Figura 2. Viabilidade de *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4. A. 100 JI/mL; B. 1.000JI/mL; C. 5.000 JI/mL; D. 10.000 JI/mL; E. 180 dias.

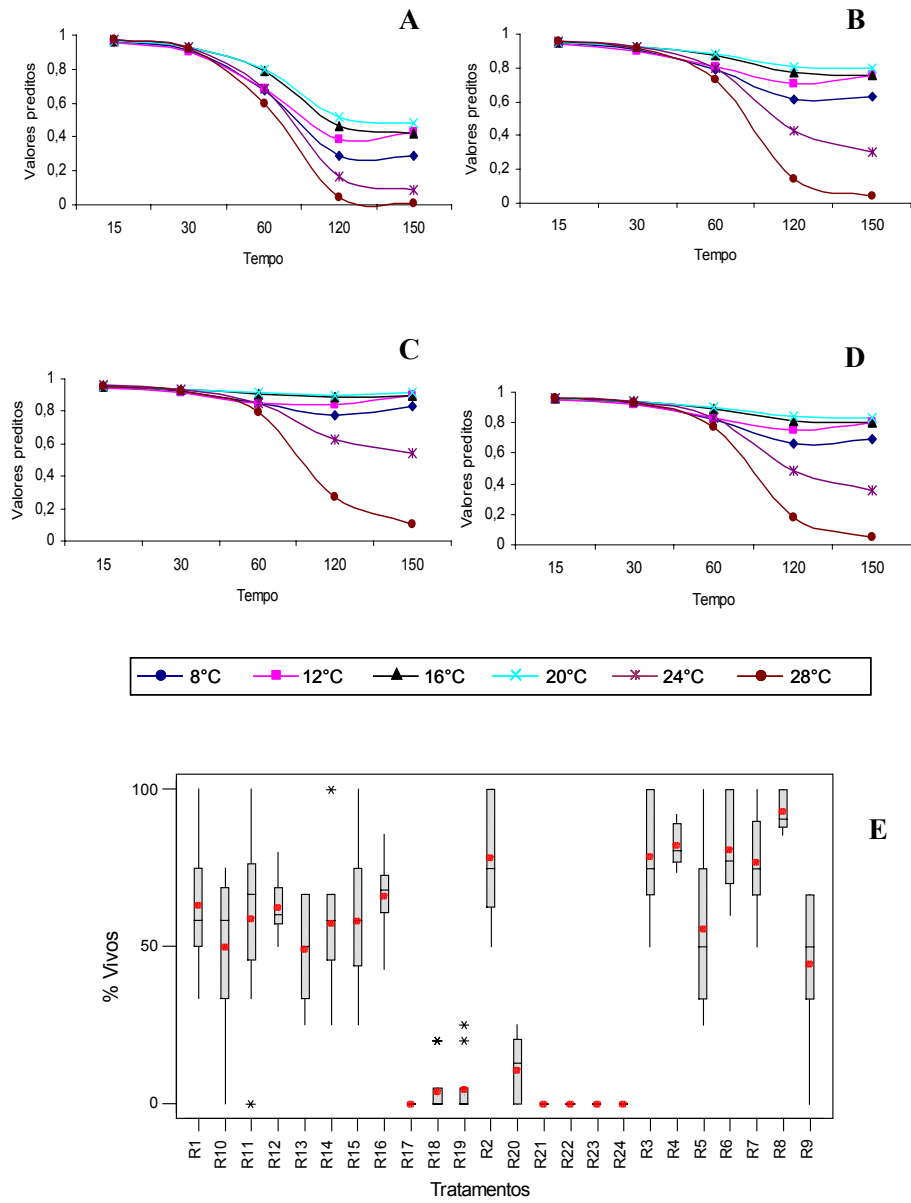


Figura 3. Viabilidade de *Steinernema riobrave*. A. 100 JI/mL; B. 1.000 JI/mL; C. 5.000 JI/mL; D. 10.000 JI/mL; E. 180 dias.

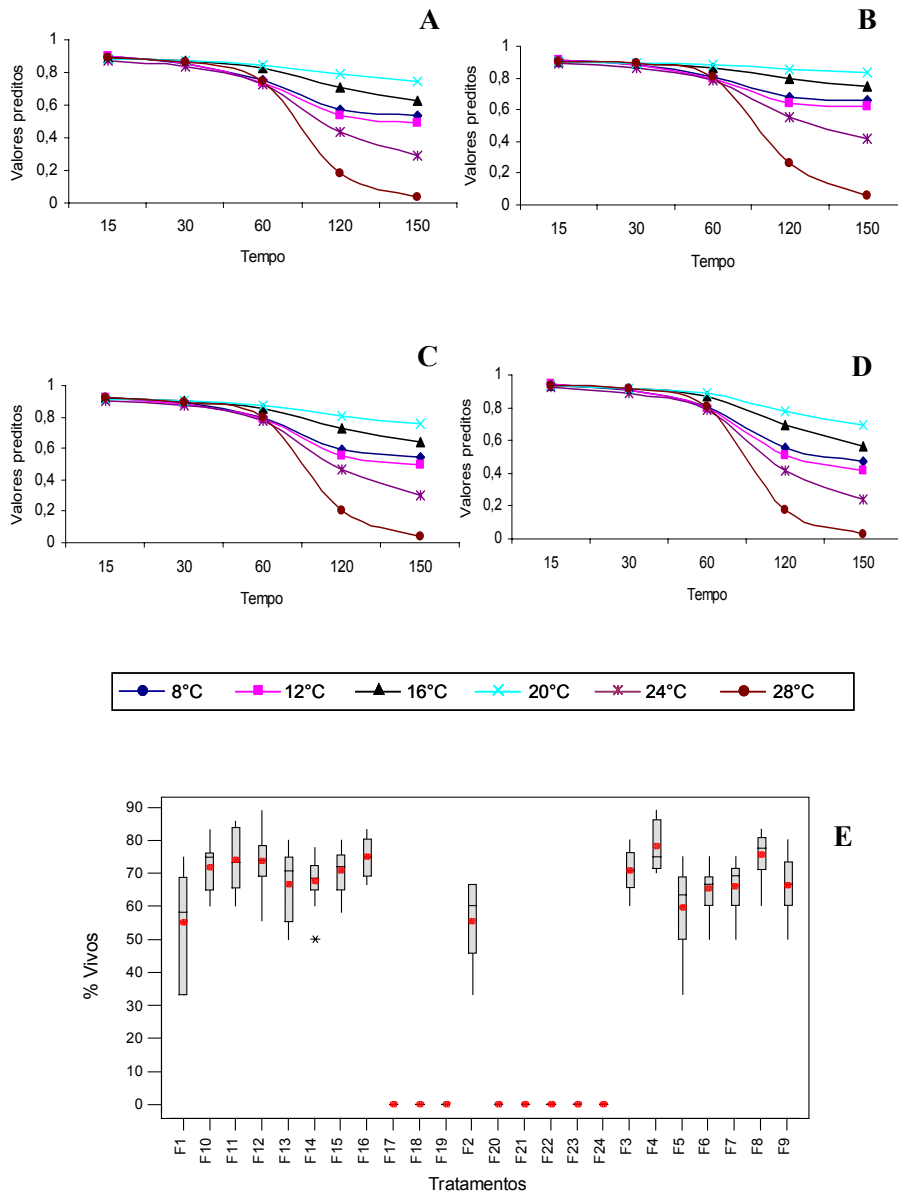


Figura 4. Viabilidade de *Steinernema carpocapsae*. A. 100 JI/mL; B. 1.000JI/mL; C. 5.000 JI/mL; D. 10.000 JI/mL; E. 180 dias.

Infectividade de nematóides entomopatogênicos sobre lagartas de *Galleria mellonella* após armazenamento

Conforme os resultados na Tabela 3, nível de significância em 5%, há evidência de que a concentração, a temperatura e o tempo de armazenamento apresentaram efeitos diferenciados entre si.

Tabela 3. Análise dos efeitos principais relativos à variável infectividade.

<i>Heterorhabditis</i> sp. CCA			
Efeito	GL	Valor Qui-Quadrado	p-valor
Concentração	3	46,5883	0,0001
Temperatura	5	112,6173	0,0001
Tempo	4	100,4931	0,0001
<i>Heterorhabditis</i> sp. JPM4			
Efeito	GL	Valor Qui-Quadrado	p-valor
Concentração	3	48,7416	0,0001
Temperatura	5	86,9037	0,0001
Tempo	4	132,9535	0,0001
<i>Steinernema riobrave</i>			
Efeito	GL	Valor Qui-Quadrado	p-valor
Concentração	3	107,5767	0,0001
Temperatura	5	77,4587	0,0001
Tempo	4	67,8282	0,0001
<i>Steinernema carpocapsae</i>			
Efeito	GL	Valor Qui-Quadrado	p-valor
Concentração	3	62,1009	0,0001
Temperatura	5	51,5663	0,0001
Tempo	4	47,3107	0,0001

Os nematóides *Heterorhabditis* sp. CCA e *Heterorhabditis* sp. JPM4 apresentaram resultados semelhantes em relação à infectividade sobre lagartas de *G. mellonella*, para todas as temperaturas testadas nos diferentes intervalos de

avaliação. A infectividade foi bastante baixa já na primeira avaliação aos 15 dias, sendo essa redução acentuada a partir dos 30 dias nas temperaturas de 8 e 12°C. Após 120 dias armazenados essa redução também ocorreu para as temperaturas de 24 e 28°C. Aos 150 dias, apenas os nematóides mantidos a 16 e 20°C foram infectantes, os quais, após 180 dias, ainda foram capazes de causar 50% de mortalidade em *G. mellonella*. Desta forma, as temperaturas de 16 e 20°C foram consideradas adequadas para armazenamento desses nematóides em relação ao parâmetro infectividade (Figura 5 A e B).

Já os nematóides *S. riobrave* e *S. carpocapsae* tiveram maior adaptação às temperaturas testadas do que os nematóides do gênero *Heterorhabditis*, apresentando uma ampla faixa de temperatura, na qual se mantiveram infectantes. Houve uma redução gradativa de infectividade principalmente para as temperaturas de 24 e 28°C até o período de 60 dias de armazenamento. Porém, a partir de 120 dias houve uma redução drástica de infectividade a 28°C e, a partir de 150 dias, também para 24°C.

Após 180 dias não foram encontrados nematóides capazes de causar infectividade em *G. mellonella*. As temperaturas de 16°C e 20°C foram consideradas adequadas para armazenamento de *S. carpocapsae* e *S. riobrave* em relação à infectividade porque, embora nas outras temperaturas ainda tenham existido nematóides infectantes, houve maior redução dessa infectividade (Figura 5 C e D).

Em relação às diferentes concentrações testadas para os quatro nematóides, observou-se maior infectividade dos juvenis infectantes armazenados nas maiores concentrações, como 5.000 e 10.000 JI/mL, em todas as temperaturas.

De acordo com Westerman (1999), existem diferenças entre as condições ideais para cada nematóide, como, por exemplo, *Heterorhabditis* sp., que em baixas temperaturas apresentam diminuição de mobilidade, infectividade e o surgimento de um processo de agregação entre eles. Este comportamento de agregação foi observado nessa pesquisa, em que *Heterorhabditis* sp. CCA e *Heterorhabditis* sp. JPM4 tiveram redução de viabilidade e infectividade em temperaturas de 8 e 12°C.

Brown & Gaugler (1997) também observaram que baixas temperaturas impedem a emergência completa de *H. bacteriophora*, causando a morte dos juvenis infectantes, que, em geral, apresentam persistência curta, de duas a três semanas, encontrando-se em raras ocasiões nematóides que persistem por estações ou anos (Lewis & Shapiro-Ilan, 2002).

Essas características também foram citadas por Kaya & Stock (1997), segundo os quais nematóides entomopatogênicos podem ser armazenados por um pequeno tempo em frascos de cultura com água destilada, sem presença de aeração. No entanto, de forma geral, os steinernematídeos podem ser armazenados de 4 a 15°C por cerca de seis a nove meses, enquanto os

heterorhabditídeos, por três a quatro meses, nesse mesmo intervalo de temperatura.

Temperaturas extremas são fatores que limitam a sobrevivência desses organismos, influenciando tanto na sobrevivência como na mobilidade e infectividade (Glazer, 2002). Além disso, juvenis infectantes de heterorhabditídeos são afetados em baixa temperatura, diminuindo a proporção de nematóides infectantes e a habilidade para procurar hospedeiros. Na temperatura de 9°C, *Heterorhabditis* sp. foi menos infectante a *Otiiorhynchus sulcatus* (Fabricius, 1775) (Curculionidae) e a *G. mellonella* do que a 20°C (Westerman, 1999).

Os resultados observados nesse estudo, em que tanto altas como baixas temperaturas foram consideradas prejudiciais para os nematóides testados, principalmente para aqueles do gênero *Heterorhabditis*, estão de acordo com os dados apresentados anteriormente.

De acordo com Lewis & Shapiro-Ilan (2002), existem grandes diferenças de longevidade de dessecação entre os nematóides, pois *H. bacteriophora* já foi encontrado sobrevivendo em temperaturas de até 40°C e infectando e se reproduzindo em hospedeiros em 30°C. Os nematóides *S. carpocapsae*, *S. glaseri* e *S. riobrave* podem tolerar temperaturas de congelamento de -4°C. No entanto, essas diferenças parecem estar relacionadas com sua adaptação térmica.

Grewal (2000) mencionou que a pequena longevidade de *S. feltiae* em 25°C pode ser devida à baixa sobrevivência em temperaturas altas, já que esta é uma espécie de região temperada; em contraste, *S. riobrave* é uma espécie tropical, com seu ótimo para armazenamento de 15°C. Com isso, possivelmente existe uma grande variação mesmo dentro do mesmo gênero, sendo necessário adequar as condições ideais para cada isolado de nematóide.

Em 5°C, *S. carpocapsae* sobrevive por maior tempo que os demais nematóides em água, ficando quiescente e conservando energia, enquanto *S. riobrave* e *S. feltiae* permanecem ativos. Dessa forma, a longevidade dos steinernematídeos a baixas temperaturas pode ser mais dependente da sua tolerância ao frio do que à quantidade de reservas energéticas (Grewal, 2000).

Segundo Jagdale & Grewal (2003) a diferença na adaptação termal está associada à acumulação de trealose, reserva de carboidratos, durante a aclimação ao frio (5°C) ou ao calor (35°C), auxiliando na manutenção da virulência durante um estresse termal. Sendo assim, a quantidade acumulada de trealose é diferente para cada espécie de nematóide em diferentes temperaturas.

A agregação ocorre principalmente quando os nematóides estão em baixas temperaturas, quando é notada uma diminuição de infectividade. Quando os nematóides estão agregados, o número de infectantes para penetrar e matar os insetos é menor, já que vários irão penetrar no mesmo inseto e poucos serão infectados e mortos, escapando muitos insetos vivos (Westerman, 1999). Assim,

pode-se considerar que a agregação está mais associada à diminuição de temperatura, formando agregados em forma de rosetas em espécies do gênero *Heterorhabditis*, do que à concentração, já que estas formas não são observadas em nematóides do gênero *Steinernema*.

Entender os parâmetros que influenciam um curto ou longo período de persistência dos nematóides é um aspecto importante tanto para garantir a sobrevivência dos juvenis infectantes em armazenamento como para liberação desses organismos no campo em sistemas de controle biológico. Conhecer as condições ideais para manutenção e multiplicação desses nematóides pode potencializar seu uso em programas de manejo integrado de pragas.

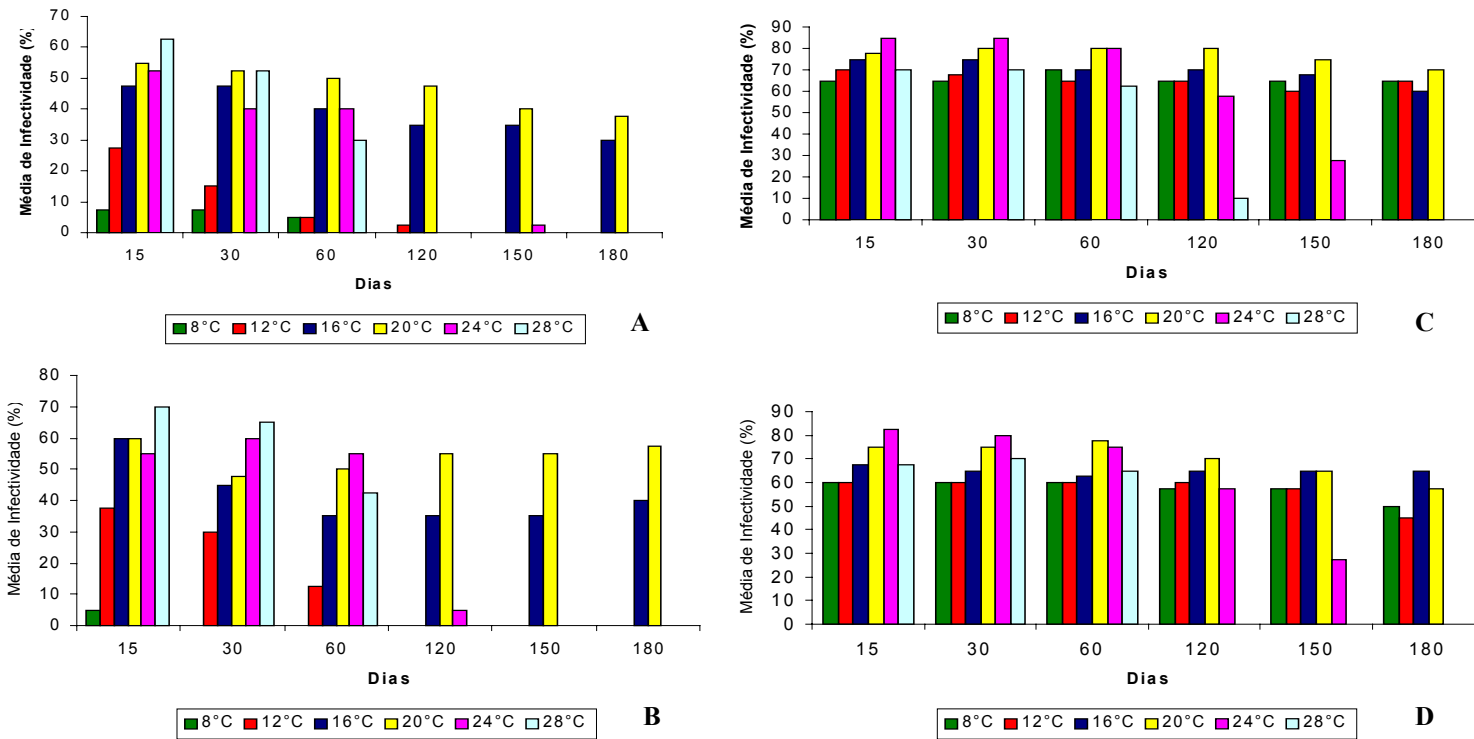


Figura 5. Infectividade de nematóides entomopatogênicos armazenados em diferentes temperaturas sobre lagartas de *Galleria mellonella* ao longo do tempo. A. *Heterorhabditis* sp. CCA; B. *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4; C. *Steinernema riobrave*; D. *Steinernema carpocapsae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 1-34.

BROWN, I. M.; GAUGLER, R. Temperature and humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematodes. **Nematologica**, Leiden, v. 43, p. n. 5, 363-375, Sept. 1997.

DUTKY, S. R.; THOMPSON, J. V.; CANTWE, G. E. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. **Journal of Insect Pathology**, San Diego, v. 6n. 4, p. 417-422, 1964.

GLAZER, I. Survival biology. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 169-188.

GREWAL, P. S. Anhydrobiotic potencial and long-term storage of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 9, p. 995-1000, Aug. 2000.

JAGDALE, G. B.; GREWAL, P. S. Acclimation of entomopathogenic nematodes to novel temperatures: trehalose accumulation and the acquisition of thermotolerance. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 145-152, Feb. 2003.

KAYA, H. K.; STOCK, P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L. **Manual of techniques in insect pathology**. New York: Academic Press, 1997. p. 281-324.

LEWIS, E. E.; SHAPIRO-ILAN, D. Host cadavers protect entomopathogenic nematodes during freezing. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 81, n. 1, p. 25-32, Oct. 2002.

MOLINA J. P.; LÓPEZ, N. J. C. Supervivencia y parasitismo de nematodos entomopatógenos para el control de *Hypothenemus hampei*, (Coleoptera: Scolytidae) en frutos de café. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, Madrid, v. 29, n. 4, p. 523-533, oct./dic. 2003.

MOLINA J. P.; LÓPEZ N. J. C. Producción in vivo de tres entomonematodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. **Revista Colombiana de Entomología**, Bogotá, v. 27, n. 1/2, p. 73-78, 2001.

PARRA, J. R. P. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 1015-1037.

WESTERMAN, P. R. Aggregation of entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp., among host insects at 9 and 20°C and effects on efficacy. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 73, n. 2, p. 206-213, Mar. 1999.

WHITE, G. F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, Washington, v. 66, p. 302-303, 1927.

ARTIGO 3

Influência da Aeração no Armazenamento de Nematóides
Entomopatogênicos (Rhabditida) em Condições de Laboratório
(Preparado de acordo com as normas da revista “Nematologia Brasileira”).

Publicado: v. 30, n. 1, p. 45-60, 2006)

VANESSA ANDALÓ¹

RICARDO S. CAVALCANTI¹

JUAN PABLO MOLINA A.²

ALCIDES MOINO JR.¹

FLÁVIO H. L. MAGALHÃES³

¹Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras, CP 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG.

²CCTA/LPP (UENF), Av. Alberto Lamego 2000, CEP 28015-620, Campos dos Goytacazes, RJ.

³Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, CP 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG.

Influência da Aeração no Armazenamento de Nematóides Entomopatogênicos (Rhabditida) em Condições de Laboratório

Resumo

Foi avaliada a influência da aeração sobre nematóides entomopatogênicos, *Steinernema carpocapsae* A11 e *Heterorhabditis* sp. JPM4, durante o período de armazenamento em frascos com água destilada. As avaliações foram realizadas aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, por meio de contagens dos juvenis infectantes (JIs), sendo determinada a viabilidade dos mesmos. Para a espécie *S. carpocapsae*, observou-se maior viabilidade nos resultados do tratamento com aeração, de 93,2% (30 dias) e 44,6% (180 dias), do que naqueles obtidos sem aeração, de 81,4% (30 dias) e 0% (180 dias). O isolado *Heterorhabditis* sp. JPM4 também apresentou maior viabilidade quando em aeração, com 91,4% aos 30 dias e 36,9% aos 180 dias, sendo observada menor viabilidade na ausência de aeração durante todas as avaliações, com 83,4% (30 dias) e 0% (180 dias).

Palavras-chave: Heterorhabditidae, Steinernematidae, controle microbiano, biologia, persistência.

Aeration Influence in Storage of Entomopathogenic Nematodes (Rhabditida)
under Laboratory Conditions

Summary

The influence of aeration on the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* A11 and *Heterorhabditis* sp. JPM4 (native isolate) was evaluated during a period of storage in bottles with distilled water. The evaluations of survival were done at 30, 60, 90, 120, 150 and 180 days, through counting viable infective juvenile (IJ). High survival in the treatment with aeration, 93.2% (30 days) and 44.6% (180 days) was observed for *S. carpocapsae*, when compared to the results without aeration (81.4% at 30 days and 0% at 180 days). *Heterorhabditis* sp. JPM4 also presented higher survival under aeration, with 91.4% at 30 days and 36.9% at 180 days. Lower survival in the absence of aeration was observed during all the evaluations, with 83.4% (30 days) and 0% (180 days).

Keywords: Heterorhabditidae, Steinernematidae, microbial control, biology, persistency.

Introdução

Os nematóides entomopatogênicos (NEPs) têm sido estudados nos sistemas agrícolas para controle de insetos, com variações no grau de sucesso. Os nematóides no terceiro estágio infectante podem viver livremente, procurando o habitat do solo para buscar um hospedeiro suscetível. Durante esse estágio os nematóides não se alimentam nem se desenvolvem. Uma vez entrando em um inseto hospedeiro, os nematóides liberam sua bactéria simbiote, a qual, em combinação com toxinas produzidas pelos nematóides, matam o hospedeiro em aproximadamente três dias. As bactérias e tecidos degradados do hospedeiro fornecem fontes de nutrientes para o desenvolvimento dos nematóides. Os nematóides geralmente passam duas gerações no corpo do hospedeiro em um período de dez dias, dependendo da temperatura e da densidade inicial de inóculo (Adams & Nguyen, 2002).

Os nematóides são organismos aeróbicos e a baixa disponibilidade de oxigênio pode reduzir a sua sobrevivência (Glazer, 2002). Os juvenis infectantes (JIs) dos nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) vivem livremente no solo, sendo que alguns tipos de solo são ambientes caracterizados por apresentar baixa oxigenação (Qiu & Bedding, 2000). O oxigênio é um fator limitante nas argilas do solo, em solos saturados ou naqueles com alto nível de matéria orgânica. Os fatores porosidade do solo,

saturação de água, temperatura, profundidade do lençol freático e respiração microbiana influem no nível de oxigênio no solo (Burman & Pye, 1980; Sierra & Renault, 1998). A habilidade dos nematóides em sobreviver em condições anaeróbicas é variável entre espécies e também entre diferentes estádios da mesma espécie (Föll et al., 1999).

Reduções na concentração de oxigênio induzem um estado de dormência (anabiose) em diversos nematóides de vida livre, sendo também notada a ocorrência desse fenômeno em NEPs dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) (Glazer, 2002). Nematóides entomopatogênicos podem ser armazenados por um curto tempo em frascos de cultura com água destilada, sem presença de aeração, com variação no tempo de sobrevivência de acordo com as diferentes espécies. De forma geral, os steinernematídeos podem ser armazenados em 4 a 15°C por cerca de 6 a 9 meses, enquanto os heterorhabditídeos, por 3 a 4 meses nesse mesmo intervalo de temperatura (Kaya & Stock, 1997).

O tempo de sobrevivência em armazenamento sem oxigênio é diretamente afetado pela temperatura, porém não é afetado pelo nível de CO₂. Em baixas temperaturas ocorre diminuição na emergência de juvenis infectantes, o que pode prolongar o tempo de sobrevivência dos nematóides que emergiram, fato relacionado ao menor consumo de oxigênio por esses nematóides (Brown & Gaugler, 1997). O glicogênio e os lipídios neutros são reservas de energia de

nematóides de vida livre, e também de parasitas de animais, relacionadas com a infectividade dos nematóides. Uma diminuição na reserva de glicogênio leva a uma diminuição na infectividade de espécies de *Steinernema* quando armazenados em água por 60 dias, mostrando uma correlação direta entre glicogênio e infectividade. Assim, apesar de esses nematóides demonstrarem habilidade de usar um metabolismo anaeróbico, existe um requerimento por oxigênio para um período maior de sobrevivência em *Steinernema* spp. (Wright et al., 1997).

Análises na reserva energética de NEPs, sob baixa concentração de CO₂, indicam uma queda nos níveis de glicogênio e trealose quando em condições anaeróbicas; entretanto, não há mudança no nível de lipídios. Quando os nematóides são novamente incubados em condições aeróbicas, os níveis de glicogênio e trealose aumentam acentuadamente, enquanto o de lipídios decresce. Isso indica que, como na maioria dos animais, JI de *Steinernema carpocapsae* sob condições anaeróbicas dependem de reservas de carboidratos para fornecimento de energia (Qiu & Bedding, 2000).

Quando armazenados sem aeração, a maior concentração de nematóides utilizada deve ser de 10.000 a 20.000 JI/mL, com coluna de água de 1 cm ou menos, já que até esses valores a ausência de aeração pode não influenciar na sobrevivência. Nematóides em altas concentrações, tais como 100.000 JI/mL, são prejudicados quando em suspensões sem fornecimento de oxigênio. Nessa

condição, o ideal é usar concentração de 10.000 até 20.000 JI/mL (variável de acordo com a espécie) e uma coluna de água de não mais que 1 cm (Woodring & Kaya, 1988).

Um dos entraves para o armazenamento de nematóides entomopatogênicos é a grande mortalidade ocorrida durante esse período, sendo que a presença de oxigênio pode propiciar maior viabilidade desses nematóides, prolongando a sua sobrevivência. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência da aeração sobre duas espécies de nematóides entomopatogênicos durante o período de armazenamento.

Material e Métodos

1. Multiplicação e manutenção dos nematóides entomopatogênicos

Os nematóides *S. carpocapsae* A11 (Weiser, 1955) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding 1982 e *Heterorhabditis* sp. JPM4 foram cultivados no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil. Esses foram mantidos em frascos Erlenmeyer em câmara climática do tipo BOD, com temperatura de $16 \pm 1^\circ\text{C}$, em suspensão aquosa com cerca de 500 a 1.000 JI/mL.

Para a multiplicação desses organismos foram utilizadas lagartas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae), criadas no

Laboratório de Patologia de Insetos de acordo com metodologia descrita por Dutky et al. (1964), utilizando-se dieta artificial modificada por Parra (1998).

Dez lagartas no último ínstar de *G. mellonella* foram transferidas para placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo papel filtro no seu interior, para multiplicação das duas espécies de NEPs utilizadas neste estudo. Simultaneamente, foi adicionado 1 mL de suspensão dos nematóides na concentração de 20 JI/lagarta. As placas foram mantidas em câmara BOD por 72h em temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e escotofase de 24h. Após confirmação da sintomatologia da morte das lagartas, estas foram transferidas para câmara seca (Molina & López, 2001) por 4 dias.

Após esse período, as lagartas foram transferidas para armadilhas de White (White, 1927) para serem coletados os JIs dos nematóides. As armadilhas foram mantidas em BOD por um período de três a sete dias. A suspensão de nematóides recolhida diariamente foi transferida para provetas com capacidade de 1.000 mL, contendo 800 mL de água destilada, para que os JIs decantassem em 24 h. Esse processo de decantação teve a finalidade de separar nematóides adultos e corpos gordurosos do inseto dos JIs. Na proveta foi também adicionado o espalhante adesivo Tween 80[®] a 0,1%. Depois de realizado o processo de purificação dos nematóides, foram feitas a diluição e a quantificação da suspensão de nematóides em placas plásticas para testes serológicos em microscópio estereoscópico.

2. Bioensaio para avaliação da influência da aeração no armazenamento de nematóides entomopatogênicos

Foi avaliada a sobrevivência de *S. carpocapsae* A11 e *Heterorhabditis* sp. JPM4, mantidas em BOD (temperatura $20 \pm 1^\circ\text{C}$, UR $70\pm 10\%$, 24 h de escotofase) até a realização das avaliações ao longo do tempo. Foram utilizados nematóides recém-emergidos (3.000 JI/mL), mantidos em potes plásticos (1.000 mL) contendo 350 mL de água destilada, com aeração fornecida por meio de compressor de ar para aquário (potência de 2 watts) conectado a uma agulha descartável através de uma mangueira de silicone e um equipo (Figura 1). Os tratamentos foram constituídos de suspensões de nematóides com e sem aeração, contendo cinco repetições/tratamento. As avaliações foram realizadas aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, por meio da contagem dos JI em placas plásticas para teste serológico, com auxílio do microscópio estereoscópico, sendo determinada a sobrevivência dos mesmos para obtenção dos dados. Esses foram submetidos à análise de variância e ao Teste Scott-Knott ($P < 0,05$) para comparação entre médias e à análise de regressão.

Resultados e Discussão

Nesse estudo verificou-se maior sobrevivência na presença de aeração durante todas as avaliações para os nematóides testados (Tabela 1).

Para *S. carpocapsae* A11, os nematóides apresentaram maior sobrevivência no tratamento com aeração, sendo que esses resultados foram decrescendo gradativamente da primeira avaliação, aos 30 dias, até a última, aos 180 dias. Quando comparados aos resultados sem aeração, verificou-se diferença significativa entre os tratamentos em todos os tempos analisados, com porcentagens de sobrevivência decrescendo acentuadamente com o decorrer das avaliações, chegando aos 180 dias sem encontrar nenhum nematóide vivo.

O mesmo padrão de resultados foi observado para *Heterorhabditis* sp. JPM4, que também apresentou diferença significativa entre os dois tratamentos para todos os intervalos de tempo testados (Tabela 1). O percentual de sobrevivência quando na presença de aeração foi diminuindo ao longo do tempo; porém, mesmo após 180 dias de armazenamento, esse isolado apresentou nematóides vivos. No tratamento sem fornecimento de oxigênio, o percentual de nematóides vivos diminuiu rapidamente ao longo do tempo, não sendo encontrados nematóides vivos na última avaliação.

Houve redução na sobrevivência dos nematóides *S. carpocapsae* A11 e *Heterorhabditis* sp. JPM4 ao longo do tempo para os tratamentos com e sem

fornecimento de oxigênio, sendo observadas curvas de regressão semelhantes para os dois nematóides. Em todos os tempos avaliados (30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias), os dados de sobrevivência do tratamento com aeração foram maiores do que naquele sem aeração (Figuras 2 e 3). Na avaliação de 180 dias foi feita a avaliação dos nematóides armazenados quanto à infectividade em lagartas de *G. mellonella*. Observou-se que nas suspensões sem fornecimento de oxigênio nenhum nematóide permaneceu infectante, enquanto no tratamento com fornecimento de oxigênio concluiu-se que *S. carpocapsae* A11 e *Heterorhabditis* sp. JPM4 causaram mortalidade média de 42 e 38% em *G. mellonella*, respectivamente.

Os resultados obtidos confirmam a importância do oxigênio para sobrevivência de NEPs não só em condições de cultivo e multiplicação *in vitro*, mas também na disponibilidade de oxigênio no solo (uma vez que os JIs ficam livres no solo em busca de um hospedeiro) e em condições de armazenamento em suspensão aquosa. Em relação à oxigenação do solo, estudos em laboratório têm mostrado que *S. carpocapsae* sobrevive em tensão de oxigênio menor que 0,5% de saturação a 20°C, em solo arenoso, que possui maior oxigenação que o solo argiloso. A sobrevivência de *S. carpocapsae* e *S. glaseri* decresce juntamente com a diminuição na concentração de oxigênio, que pode ocorrer pelo aumento na saturação de água (Burman & Pye, 1980; Kung et al., 1990).

Qiu & Bedding (2000) estudaram a manutenção da infectividade e as mudanças fisiológicas em *S. carpocapsae* sob condições anaeróbicas e verificaram que, em condições de aeração, a taxa de sobrevivência de JIs diminuiu gradativamente nas seis primeiras semanas (91%), na sétima semana (78%) e na oitava semana (55%). Observou-se também que quando os JIs foram incubados em condições anaeróbicas, estes se tornaram inativos em 16 horas; porém, puderam voltar à atividade quando colocados em condição de oxigenação se não fossem ultrapassados sete dias sem oxigênio. O tempo necessário para recuperação foi proporcional ao tempo que os nematóides foram mantidos em condição anaeróbica, variando de minutos a 24 horas no caso de terem ficado sete dias nessas condições. Esses resultados corroboram os obtidos no presente experimento.

A difusão de oxigênio em pequenos animais ocorre rapidamente, como em *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1889) (Rhabditidae), fazendo com que este não se torne um fator limitante para a respiração a menos que não seja ultrapassado um limite extremo de concentração abaixo de 4% (Gray et al., 2004). Dessa forma, como foi observado nesse experimento, mesmo sem o fornecimento de oxigênio os nematóides ainda permanecem viáveis por um período; porém, ao longo do tempo a diminuição na oxigenação os leva à morte.

O glicogênio é a principal reserva energética de carboidratos nos nematóides. A síntese de compostos como a trealose, inositol e glicerol durante

o processo de desidratação ocorre por meio do uso de reservas de glicogênio e lipídios. O uso do glicogênio é um importante fator para manutenção da infectividade quando o nível de lipídios estiver baixo (Wright & Perry, 2002). Quando armazenados em água, os NEPs utilizam suas reservas de forma diferente, mudando seu comportamento locomotor. Juvenis infectantes de *S. carpocapsae* entram em quiescência, adotando postura estacionária, enquanto em *Heterorhabditis* ocorre o processo de agregação. Dessa forma, esse seria um modo de diminuir o gasto energético e superar condições de baixa oxigenação (Patel et al., 1997; Westerman, 1999).

Uma alta concentração de NEPs/mL (acima de 20.000 JI/mL) pode levar a uma redução na oxigenação e à morte dos nematóides. Assim, suspensões aquosas com concentrações até 10.000 JI/mL podem ser utilizadas, já que os NEPs se mantêm viáveis e infectantes; todavia, na presença de aeração essas características são prolongadas (Andaló et al., 2005; Woodring & Kaya, 1988). Nesse experimento, a concentração utilizada de 3.000 JI/mL mostrou que, mesmo em baixa concentração, é necessária a utilização de uma fonte de oxigênio, pois ao longo do tempo as reservas de oxigênio vão se esgotando.

Assim, constatou-se que a sobrevivência dos nematóides foi maior com fornecimento de aeração, para todos os intervalos de tempo observados. A utilização de oxigênio para NEPs em suspensão aquosa no armazenamento permitiu maior sobrevivência por um período maior de tempo.

Literatura Citada

ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 1-34.

ANDALÓ, V.; MOINO JR., A.; MOLINA ACEVEDO, J. P.; CAVALCANTI, R. S.; CARVALHO, F. A. Efeito da temperatura e concentração na sobrevivência de nematóides entomopatogênicos em condições de armazenamento, visando seu uso no controle microbiano de pragas. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, Madrid, v. 31, n. 2, p. 253-265, abr./jun. 2005.

BROWN, I. M.; GAUGLER, R. Temperature and humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematodes. **Nematologica**, Leiden, v. 43, n. 5, p. 363-375, Sept. 1997.

BURMAN, M.; PYE, A. E. *Neoplectana carpocapsae*: respiration of infective juveniles. **Nematologica**, Leiden, v. 26, n. 2, p. 214-218, May 1980.

DUTKY, S. R.; THOMPSON, J. V.; CANTWE, G. E. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. **Journal of Insect Pathology**, San Diego, v. 6, n. 4, p. 417-422, 1964.

FÖLL, R. L.; PLEYERS, A.; LEWANDOVSKI, G. J.; WERMTER, C.; HEGEMANN, V.; PAUL, R. J. Anaerobiosis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Elmsford, v. 124, n. 3, p. 269-280, Nov. 1999.

GLAZER, I. Survival biology. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 169-188.

GRAY, J.M.; KAROW, D.S.; LU, H.; CHANG, A.J.; CHANG, J.S.; ELLIS, R.E.; MARLETTA, M.A.; BARGMANN, C.I. Oxygen sensation and social feeding mediated by a *Caenorhabditis elegans* guanilate cyclase homologue. **Nature**, London, v. 430, n. 6997, p. 317-322, July 2004.

KAYA, H. K.; STOCK, P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L. **Manual of techniques in insect pathology**. New York: Academic Press, 1997. p. 281-324.

KUNG, S. P.; GAUGLER, R.; KAYA, H. K. Influence of soil pH and oxygen on entomopathogenic nematode persistence. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 22, n. 4, p. 440-445, Oct. 1990.

MOLINA J. P.; LÓPEZ N. J. C. Producción in vivo de tres entomonematodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. **Revista Colombiana de Entomología**, Bogotá, v. 27, n. 1-2, p. 73-78, 2001.

PARRA, J. R. P. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 1015-1037.

PATEL, M. N.; STOLINSKI, M.; WRIGHT, D. J. Neutral lipids and the assessment of infectivity in entomopathogenic nematodes: observations on four *Steinernema* species. **Parasitology**, New York, v. 114, n. 6, p. 489-496, June 1997.

QIU, L.; BEDDING, R. A. Energy metabolism and survival of the infective juveniles of *Steinernema carpocapsae* under oxygen-deficient conditions. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 32, n. 3, p. 271-280, Sept. 2000.

SIERRA, J.; RENAULT, P. Temporal pattern of oxygen concentration in a hydromorphic soil. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 62, n. 6, p. 1398-1405, Nov./Dec. 1998.

WESTERMAN, P. R. Aggregation of entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp., among host insects at 9 and 20°C and effects on efficacy. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 73, n. 2, p. 206-213, Mar. 1999.

WHITE, G.F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, Washington, v. 66, p. 302-303, 1927.

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. **Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: a handbook of biology and techniques**. Arkansas: Nematode Subcommittee of the Southern Regional, 1988. 30 p.

WRIGHT, D. J.; GREWAL, P. S.; STOLINSKI, M. Relative importance of neutral lipids and glycogen as energy stores in dauer larvae of two entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema feltiae*. **Comparative Biochemistry Physiology**, Oxford, v. 118, n. 2, p. 269-273, Oct. 1997.

WRIGHT, D. J.; PERRY, R. N. Physiology and biochemistry. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 145-168.

Tabela 1. Porcentagem de sobrevivência de *Steinernema carpocapsae* A11 e *Heterorhabditis* sp. JPM4 com e sem aeração ao longo do tempo (gl = 5; F = 19,1; P = 0,0).

Tempo (dias)	Aeração	<i>S. carpocapsae</i> A11 ¹	<i>Heterorhabditis</i> sp. JPM 4 ¹
30	com	93,2 ± 1,1 a	91,4 ± 2,1 a
	sem	81,4 ± 1,9 b	83,4 ± 1,6 b
60	com	92,0 ± 0,3 a	90,2 ± 1,6 a
	sem	81,4 ± 1,9 b	81,8 ± 0,6 b
90	com	87,4 ± 0,9 a	85,4 ± 0,3 a
	sem	63,8 ± 2,0 b	72,6 ± 2,4 b
120	com	83,8 ± 2,3 a	82,2 ± 1,0 a
	sem	58,8 ± 2,0 b	69,2 ± 1,4 b
150	com	74,9 ± 1,2 a	70,1 ± 1,4 a
	sem	45,3 ± 4,3 b	41,8 ± 2,2 b
180	com	44,6 ± 3,1 a	36,9 ± 3,5 a
	sem	0 ± 0 b	0 ± 0 b

Médias seguidas por letras distintas nas colunas dentro de cada tempo diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P < 0,05).

¹ M ± EP (M)



Figura 1. A. Potes plásticos contendo suspensões de nematóides armazenadas com e sem aeração em câmara climatizada tipo BOD; B. Pote plástico contendo suspensão de nematóides sem aeração; C. Pote plástico contendo suspensão de nematóides com aeração; D. Compressor de ar para aquário.

Steinernema carpocapsae

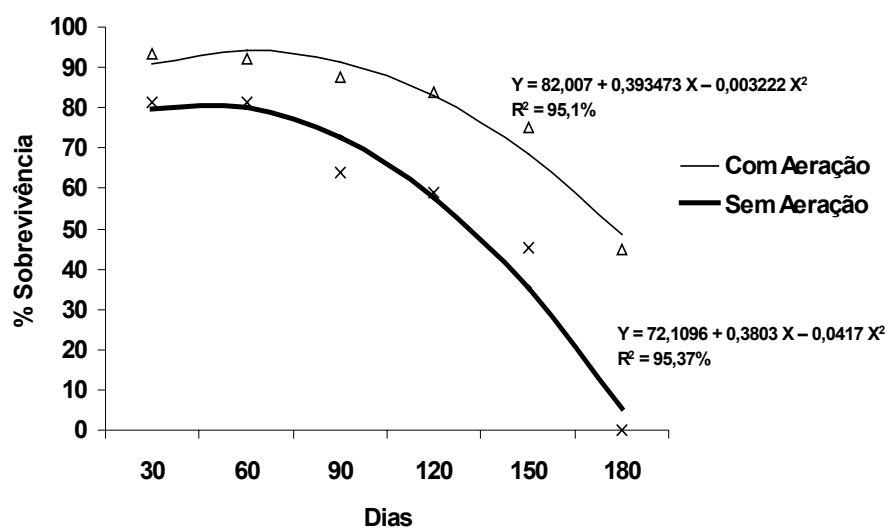


Figura 2. Sobrevivência média estimada e observada para *Steinernema carpocapsae* com e sem sistema de aeração.

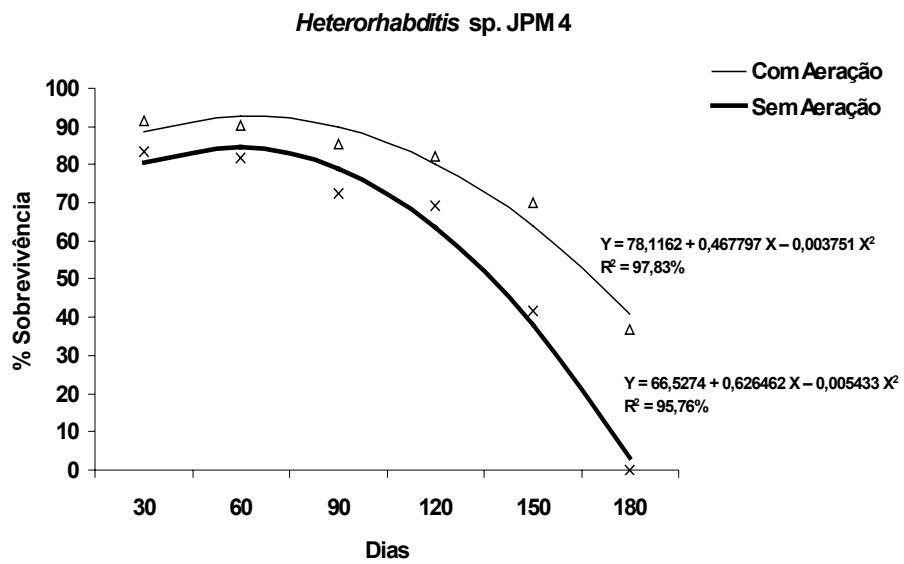


Figura 3. Sobrevivência média estimada e observada para *Heterorhabditis* sp. JPM4 com e sem sistema de aeração.

ARTIGO 4

Influência do tempo e da temperatura na reserva lipídica de juvenis infectantes de nematóides entomopatogênicos em armazenamento (Preparado de acordo com as normas da revista “Manejo Integrado de Plagas y Agroecología”)

VANESSA ANDALÓ¹

ALCIDES MOINO JR¹

CLEBER MAXIMINIANO²

VICENTE PAULO CAMPOS²

LÚCIA APARECIDA MENDONÇA¹

¹Departamento de Entomologia - UFLA, C.P. 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG.

²Departamento de Fitopatologia/Laboratório de Nematologia - UFLA, C.P. 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG.

RESUMEN. La principal fuente de energía de los nemátodos entomopatógenos (NEP) en su fase infectiva son los lípidos. El objetivo de este trabajo fué evaluar el porcentaje de lípidos de juveniles infectantes (JI) almacenados en diferentes temperaturas y asociarlo con su infectividad. Suspenciones de *Steinernema carpocapsae*, *S. riobrave*, *Heterorhabditis* sp. JPM4, *Heterorhabditis* sp. CCA y *Heterorhabditis* sp. PI fueron incubadas a 15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 días a 8, 16, 20, 24 y 28°C. La cantidad de lípidos fué evaluada através del método colorimétrico. Para cada tratamiento se evaluó la infectividad de los JI en *Galleria mellonella*. Todos nemátodos presentaron reducción de lípidos a lo largo del tiempo. Los nemátodos mantuvieron sus lípidos por mayor tiempo en 8, 16 y 20°C, ya en 24 y 28°C el porcentaje disminuíó rápidamente. Las temperaturas de 16 y 20°C fueron las que menos afectaron la infectividad al final de los 180 días. A pesar de 8°C haber sido considerada adecuada para manutención de la reserva de lípidos, ésta no fué adecuada para mantener la infectividad de los JI.

Palabras Clave: control biológico, Heterorhabditidae, Steinernematidae, control microbiano, supervivencia.

ABSTRACT. Influence of time and temperature on lipid reserve in entomopathogenic nematodes during storage

The main source of energy of entomopathogenic nematodes (EPN) while infective juveniles is the lipids. The purpose of this study was evaluating the percentage of infective juveniles (IJ) lipids stored in different temperatures and associate it with its infectivity. Suspensions of *Steinernema carpocapsae*, *S. riobrave*, *Heterorhabditis* sp. JPM4, *Heterorhabditis* sp. CCA and *Heterorhabditis* sp. PI were maintained for 15, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 days in 8, 16, 20, 24 and 28°C. The lipids were evaluated through the colorimetric method. It was evaluated for each treatment the infectivity of IJ in *Galleria mellonella*. The nematodes kept its lipids reserves for more time in the temperatures 8, 16 and 20°C, while in 24 and 28°C the percentage of lipids reduced quickly. The temperatures of 16 and 20°C provided the least reduction of infectivity after 180 days of storage. Despite the fact that at 8°C the maintenance of lipid reserve was adequate, it was not adjusted to keep for IJ infectivity.

Key words: biological control, Heterorhabditidae, Steinernematidae, microbial control, survival.

INTRODUÇÃO

Os nematóides entomopatogênicos (NEP) das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae são alternativos ao controle químico de muitos insetos-praga. A extensiva distribuição dos membros dessas famílias é um indicativo de suas habilidades de se adaptar e sobreviver em condições ambientais de estresse, como mudanças na tensão osmótica, temperatura, dissecação, ação de produtos químicos e predadores (Finnegan et al., 1999; Glazer & Salame, 2000).

Os juvenis infectantes (JI) desses nematóides são adaptados a procurar pelo hospedeiro e sobreviver fora dele, sendo que suas reservas energéticas os capacitam a sobreviver por semanas ou mesmo meses no solo ou armazenados (Hatab & Gaugler, 1999; Hass et al., 2002; Qiu & Bedding, 2000). Alguns JI tornam-se inativos quando armazenados em água a fim de conservarem energia, e essa propensão à inatividade varia de acordo com a espécie (Fitters & Griffin, 2004).

Alguns nematóides procuram por hospedeiros que ficam perto da superfície do solo, os chamados “cruiser”, os quais têm grande mobilidade, com grande espectro de hospedeiros. Outros, chamados de “ambusher”, ficam parados enquanto o hospedeiro se movimenta no solo, num mecanismo conhecido como “nictating”. A quantidade de reserva

lipídica está associada ao comportamento de cada nematóide (Grewal et al., 2001).

A seleção desses nematóides para uso comercial depende do conhecimento de seus atributos fisiológicos e bioquímicos, a fim de obter uma boa eficácia no controle. A quantidade de lipídios encontrados nos JI, que pode ser influenciada pelas condições ambientais, tem influência na viabilidade e infectividade desses nematóides (Christophers et al., 1997; Wright & Perry, 2002).

Os lipídios são reservas energéticas em nematóides de habitats aeróbicos, sendo que lipídios saturados têm valor calórico maior que lipídios insaturados. São a principal fonte de energia dos JI, com valores de conteúdo total variando de 11 a 67% de seu peso seco. Os lipídios neutros compreendem, em geral, mais de 70% do total de lipídios. Os trigliceróis são lipídios de armazenamento da maioria dos organismos e a maior parte dos lipídios neutros em nematóides (Barrett & Wright, 1998; Chitwood, 1998).

A alta taxa de lipídios em JI permite uma maior sobrevivência; conseqüentemente, os nematóides são dependentes de lipídios para sobreviver a um longo período de armazenamento. Diferenças na

composição de lipídios podem levar a diferenças na qualidade fisiológica, como sobrevivência e patogenicidade (Hatab & Gaugler, 1999; Menti et al., 2003). Por meio dessa reserva, os nematóides irão manter-se vivos até encontrarem um novo hospedeiro para parasitar (Lee & Atkinson, 1977; Van Gundy, 1985). Os JI dos nematóides entomopatogênicos têm mostrado uma redução na infectividade de acordo com o tempo de armazenamento e com o conteúdo de lipídio total (Fitters & Griffin, 2004; Hass et al., 2002; Lewis et al., 1995).

A determinação do conteúdo de lipídio neutro pode ser feita quimicamente, por cromatografia, ou histologicamente, usando o corante “Oil Red O” (Croll, 1972; Lee, 1960). Os métodos químicos têm a desvantagem de gastar muito tempo e precisar de grandes quantidades de nematóides para obtenção de uma simples leitura; no entanto, o uso do corante possibilita uma leitura mais rápida e pode ser aplicado por indivíduo. A análise da imagem (Stamps & Linit, 1995) tem sido usada para quantificar o grau de coloração causada pelo “Oil Red O” nos nematóides. Através da medição da área, esse procedimento permite que um grande número de nematóides seja examinado em curto tempo, pois os indivíduos podem ser medidos, fornecendo um resultado mais

completo de como uma população utiliza suas reservas de lipídios. O uso desse método foi validado por meio da comparação com os resultados obtidos pelo método de cromatografia a gás (Patel et al., 1997).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o porcentual de lipídios de JI de nematóides entomopatogênicos quando armazenados em diferentes temperaturas e associar o gasto desses lipídios com a sua infectividade.

MATERIAL E MÉTODOS

Multiplicação dos nematóides entomopatogênicos

Os inóculos para multiplicação dos nematóides a serem usados no experimento foram mantidos em frascos Erlenmeyer em câmara climatizada do tipo BOD com temperatura de 16°C, em suspensão aquosa com cerca de 500 JI/mL.

Para a multiplicação foram usadas lagartas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae), criadas no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia (UFLA) de acordo com metodologia descrita por Dutky et al. (1964), utilizando-se dieta artificial modificada por Parra (1998).

Dez destas lagartas de tamanho aproximado foram selecionadas e posteriormente colocadas em uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro, com uma folha de papel filtro no fundo, na qual foi inoculado 1 mL da suspensão com os nematóides, com concentração de 20 ± 5 JI por lagarta. As placas foram mantidas em câmara BOD por 72 horas, em temperatura de $24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ e escotofase de 24 h, até a morte das lagartas, as quais foram retiradas e colocadas em placas de Petri de 9 cm com papel filtro seco por 4 dias (Molina & López, 2001).

Após esta fase foi montada a armadilha modificada de White (White, 1927), na qual foram colocadas dez lagartas mortas por nematóides e cerca de 3 mL de água no fundo da placa. As armadilhas foram colocadas em BOD em temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ por um período de 3 a 7 dias. A suspensão recolhida diariamente foi transferida para provetas com capacidade de 1000 mL, contendo 800 mL de água destilada mais espalhante adesivo Tween 80[®] a 0,1%, sendo os JI decantados no fundo da proveta, com a finalidade de separá-los de corpos gordurosos do inseto. Depois de realizado o processo de purificação dos nematóides, realizou-se a quantificação da suspensão em placas de poliestireno para testes serológicos.

Influência da temperatura e do tempo de armazenamento no porcentual de lipídios de juvenis infectantes de nematóides entomopatogênicos e na sua infectividade sobre lagartas de *Galleria mellonella*

Suspensões dos nematóides *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding 1982, *S. riobrave* Cabanillas, Poinar & Raulston, 1994, *Heterorhabditis* sp. JPM4, *Heterorhabditis* sp. CCA e *Heterorhabditis* sp. PI foram incubadas por 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias em água destilada parada nas temperaturas de 8, 16, 20, 24 e 28°C, com 24 h de escotofase, na concentração de 3.000 JI/mL.

Foram utilizados copos plásticos de 110 mL com tampa, de acordo com os tratamentos e repetições, colocando 40 mL de suspensão em cada repetição. As tampas foram perfuradas, deixando um orifício de aproximadamente 2 cm de diâmetro para possibilitar aeração. Foram usadas quatro repetições para cada tratamento, preparando uma lâmina para cada repetição. Mediu-se a área de três nematóides escolhidos ao acaso. Antes da retirada das alíquotas das suspensões para as avaliações, estas foram agitadas, a fim de homogeneizá-las.

A concentração de lipídios neutros no corpo dos JI foi estudada pelo método colorimétrico, utilizando o corante “Oil Red O” (Christophers et al., 1997; Storey, 1983). Preparou-se uma solução com 0,5g desse corante em 100 mL de álcool absoluto, agitando por 15 minutos e realizando posterior filtração em papel filtro Whatman nº 1. Foi feito o armazenamento em 5°C em frasco de vidro escuro para proteger da luz.

Foram adicionados 3 mL da solução corante “Oil Red O” sobre a suspensão concentrada em 0,5 mL dos JI, posteriormente aquecendo em banho-maria a 60°C por 20 minutos. O resfriamento foi feito em temperatura ambiente, aguardando os nematóides decantarem. Em seguida descartou-se cerca de 2,5 mL do sobrenadante, sendo aos nematóides restantes no fundo do tubo adicionados 3 mL de uma solução de água destilada + glicerina pura (1:1) para posterior armazenamento em temperatura ambiente. As lâminas, com os JI de cada tratamento, foram montadas, observadas em microscópio trinocular e os nematóides, fotografados. A área total do corpo do nematóide e a área colorida em vermelho, correspondente à de lipídios, foram obtidas utilizando as fotografias no programa “Image Tools for Windows”, versão 3.0. Desta

forma, através da área colorida de vermelho foi possível obter o percentual de lipídios neutros em relação à área total do corpo do JI.

No teste de infectividade, cinco lagartas de *G. mellonella* foram colocadas em uma placa de Petri de 5 cm com papel filtro ao fundo. Uma alíquota de 0,5 mL de cada suspensão foi aplicada. Essas alíquotas foram retiradas dos mesmos tratamentos preparados para o teste de coloração de lipídios, com quatro repetições para cada tratamento. As placas foram colocadas em câmara BOD, com temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, e após três dias foi avaliada a mortalidade das lagartas. Os dados de porcentagem de lipídios e de infectividade foram submetidos à análise de regressão para avaliação do efeito do tempo de armazenamento e análise de correlação entre os parâmetros sobrevivência e infectividade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Influência da temperatura e do tempo de armazenamento no percentual de lipídios de juvenis infectantes de nematóides entomopatogênicos

O teor de lipídios avaliado pela porcentagem de área colorida do corpo dos JI variou entre as espécies testadas, sendo que os valores

máximos foram encontrados nos JI recém-emergidos (Figs. 3-7). Obteve-se coloração mais intensa na região do intestino, menor na parte anterior e irregularmente distribuída ao longo do corpo. A coloração foi decrescendo com o aumento do período de armazenamento (Figs. 1 e 2).

Todos os nematóides estudados apresentaram redução no percentual de lipídios ao longo do tempo; no entanto, houve variação de acordo com a temperatura de armazenamento. As temperaturas de 8, 16 e 20°C foram as em que os nematóides mantiveram suas reservas lipídicas por período maior de tempo, enquanto nas temperaturas de 24 e 28°C o percentual de lipídios diminuiu rapidamente. Após 180 dias armazenados, os JI ainda mantiveram um percentual de lipídios alto, acima de 50% nas temperaturas de 8 e 16°C. Nas temperaturas de 24 e 28°C, a taxa de lipídios caiu rapidamente ao longo do tempo, sendo que aos 90 dias os JI já apresentavam menos que 50% de suas reservas e, aos 120 dias, em muitos as reservas já estavam esgotadas (Figs. 3A, 4A, 5A, 6A e 7A).

Os isolados estudados apresentaram maior redução de lipídios nas temperaturas de 24 e 28°C, tanto aqueles do gênero *Heterorhabditis* como de *Steinernema*; porém, *S. carpocapsae* e *S. riobrave* mantiveram maiores reservas do que os JI dos isolados de *Heterorhabditis* nas temperaturas

avaliadas (Figs. 3A, 4A, 5A, 6A e 7A). A 8 e 16°C os JI pararam de se movimentar, mas nas temperaturas de 20, 24 e 28°C os JI permaneceram em movimento, gastando energia e, conseqüentemente, reduzindo o teor de lipídios. As temperaturas de 8 e 16°C foram as que proporcionaram a manutenção de maior porcentual de lipídios ao longo do tempo para todos os nematóides testados, em função desta menor atividade.

Influência da temperatura e do tempo na infectividade de juvenis infectantes de nematóides entomopatogênicos em armazenamento sobre lagartas de *Galleria mellonella*

As cinco espécies de nematóides, quando recém-emergidos, causaram alta taxa de mortalidade em *G. mellonella*. Esse porcentual de infectividade foi se modificando ao longo do tempo de armazenamento e de acordo com as temperaturas (Figs. 3B, 4B, 5B, 6B e 7B).

Após 15 dias houve redução de infectividade nas temperaturas de 24 e 28°C para todos os nematóides. Com esse mesmo tempo de avaliação, os JI de *S. carpocapsae* e *S. riobrave* mantiveram-se infectantes, enquanto os JI de *Heterorhabditis* sp. PI, *Heterorhabditis* sp. JPM4 e *Heterorhabditis* sp. CCA tiveram redução de infectividade na

temperatura de 8°C. A redução na temperatura de 8°C também ocorreu para os JI de *Steinernema*, porém de forma mais gradativa, ocorrendo principalmente a partir dos 90 dias de armazenamento. A infectividade dos JI foi reduzida a 8°C, observando-se que *Heterorhabditis* sp. CCA após 60 dias de armazenamento nessa temperatura não causou mortalidade a lagartas de *G. mellonella*. Os JI do gênero *Heterorhabditis* mostraram-se menos tolerantes a temperaturas extremas de 8, 24 e 28°C do que aqueles do gênero *Steinernema* em relação à infectividade, apesar de essas temperaturas também atuarem negativamente sobre esses nematóides (Figs. 3B, 4B, 5B, 6B e 7B).

As temperaturas de 16 e 20°C foram as que proporcionaram maior manutenção da infectividade ao final dos 180 dias de armazenamento. Para *S. carpocapsae* e *S. riobrave*, a temperatura que menos afetou a infectividade foi a de 16°C, obtendo-se 72,5% e 70,0%, respectivamente.

Para o nematóide *Heterorhabditis* sp. CCA, a 16°C houve 62,5% de infectividade, enquanto a 20°C houve 60% ao final dos 180 dias, apresentando, ambas as temperaturas, curvas de regressão bastante semelhantes (Fig. 6B). Para o nematóide *Heterorhabditis* sp. PI, o maior percentual de infectividade ao fim do período avaliado foi de 40% em

20°C. Também para os JI de *Heterorhabditis* sp. JPM4 observou-se maior infectividade (67,5%) a 20°C (Figs. 3B, 4B, 5B, 6B e 7B).

Obteve-se uma correlação direta entre porcentagem de lipídios e infectividade na maioria das vezes, evidenciando que a diminuição do porcentual de lipídios provocou também uma redução na infectividade sobre lagartas de *G. mellonella* (Figs. 3C, 4C, 5C, 6C e 7C).

Esse fato foi observado para todas as temperaturas testadas em *S. carpocapsae* e *S. riobrave*. No entanto, quando analisados os JIs de *Heterorhabditis*, observou-se que na temperatura de 8°C houve correlação inversa, ou seja, apesar de a infectividade ter diminuído, pois os nematóides morreram, a partir de 60 dias de armazenamento o teor de lipídios manteve-se alto. Assim, apenas para *Heterorhabditis* sp. PI, *Heterorhabditis* sp. JPM4 e *Heterorhabditis* sp. CCA na temperatura de 8°C obteve-se coeficiente de correlação negativo, pois mesmo mantendo o teor de lipídios a infectividade diminuiu (Figs. 3C, 4C, 5C, 6C e 7C).

Na temperatura de 16°C após 180 dias, todos os nematóides, exceto *Heterorhabditis* sp. PI, causaram mais de 50% de mortalidade em *G. mellonella*. O nematóide *S. carpocapsae* apresentou menos que 50% de infectividade quando sua reserva lipídica era inferior a 20%; para

S. riobrave, constatou-se infectividade menor que 50% quando seu porcentual de lipídios foi menor que 32%. Para os isolados de *Heterorhabditis* na temperatura de 8°C, mesmo com alto teor de lipídios a infectividade foi baixa. Assim, para *Heterorhabditis* sp. CCA, nessa temperatura, mesmo com 80% de lipídios não houve mortalidade em *G. mellonella*; porém, para as demais temperaturas, apenas abaixo de 15% de reserva esse nematóide apresentou infectividade inferior a 50%.

Para *Heterorhabditis* sp. JPM4 e *Heterorhabditis* sp. PI a 8°C, mesmo com 77% e 70%, respectivamente, esses não causaram mortalidade em *G. mellonella*; no entanto, nas demais temperaturas valores de lipídios abaixo de 15% e 46%, respectivamente, foram condição para causar menos de 50% de mortalidade. Apesar de a temperatura de 8°C ter sido considerada adequada para manutenção da reserva de lipídios, não o foi para manter os JI.

A diferença na adaptação térmica está associada à acumulação de trealose, reserva de carboidratos, glicogênio e reserva lipídica durante a aclimação ao frio ou ao calor, auxiliando na manutenção da virulência durante um estresse térmico. A quantidade acumulada de dessas reservas é diferente para cada espécie de nematóide em diferentes temperaturas

(Grewal, 2000; Jagdale & Grewal, 2003). Essa diferença entre espécies pode ser observada no presente trabalho, pois nematóides do gênero *Steinernema*, de forma geral, mantiveram sua reserva lipídica por um período maior de tempo nas temperaturas testadas, inclusive na temperatura de 8°C.

Alguns JI tornam-se inativos quando armazenados em água a fim de conservar energia. Essa propensão a se tornar inativo varia de acordo com a espécie. De acordo com Fitters & Griffin (2004) e Lewis et al. (1995), a porcentagem de JI inativos em água para *S. carpocapsae* é muito maior do que para *S. glaseri* e *H. bacteriophora*.

A resposta a um estresse seleciona populações que são geneticamente adaptadas a sobreviver sob diversas pressões ambientais (Bornstein-Forst et al., 2005; Serwe-Rodriguez et al., 2004). Assim, algumas espécies do gênero *Steinernema* estariam mais adaptadas a estresses causados por temperaturas extremas.

O grau de insaturação de lipídios em populações de *Heterorhabditis* tem uma variação menor do que a de populações de *Steinernema*. Essa diferença é marcada pela presença de ácidos graxos em *Steinernema*, os quais não são encontrados em *Heterorhabditis* ou são

encontrados em baixa concentração. Assim, populações de *Steinernema* sobrevivem por mais tempo do que populações de *Heterorhabditis* e, além disso, o conteúdo de lipídios declina muito mais rápido para este nematóide. O declínio no percentual de lipídio foi observado a partir da 4^a semana a 23°C (Fitters et al., 1999; Lewis et al., 1995; Patel et al., 1997).

Desta forma, esses resultados corroboram os obtidos no presente trabalho, pois houve uma redução no percentual de lipídios principalmente a partir de 30 dias para os isolados de *Heterorhabditis* na temperatura de 24°C, além de apresentarem redução mais acelerada que as espécies de *Steinernema*. Fodor et al. (1990) mostraram que *S. carpocapsae* pode regular a umidade de suas membranas dependendo da temperatura e Hatab & Gaugler (1999) observaram que *S. riobrave* acumula grandes proporções de ácidos graxos quando em altas temperaturas e isso pode contribuir para a sua tolerância térmica.

De acordo com Patel et al. (1997), a sobrevivência de *S. carpocapsae* e *S. riobrave* varia entre 120 e 135 dias e a infectividade declina em *S. riobrave*, *S. feltiae* e *S. glaseri* conforme suas reservas lipídicas vão sendo utilizadas. Em JI de *S. carpocapsae*, altos níveis de infectividade são mantidos mesmo com taxas de lipídio relativamente

baixas. Isto mostra como são heterogêneas as populações de nematóides, sendo que cada espécie utiliza suas reservas em função de suas necessidades intrínsecas. Assim, observa-se a importância na diferença da atividade locomotora dos JI durante o armazenamento e que alguns nematóides são capazes de entrar em quiescência, reduzindo a utilização de lipídios.

O tamanho dos JI e a quantidade inicial de lipídios parecem estar relacionados com a sobrevivência do nematóide e com a forma como ele irá utilizar seus lipídios. Espécies pequenas como *S. carpocapsae* e *S. riobrave* utilizam seus lipídios mais rapidamente que os nematóides *S. feltiae* e *S. glaseri*, que têm tamanho maior (Patel et al., 1997).

Os JI de *S. carpocapsae* apresentaram rápido declínio na infectividade a partir de 90 dias de armazenamento, sendo o mesmo resultado obtido por Wright et al. (1997). Esses autores também ressaltam que o uso de glicogênio como reserva energética cessa a partir desse período de armazenamento, mas o uso das reservas lipídicas continua. Isso possivelmente pode explicar porque a infectividade desse nematóide declina rapidamente a partir de 90 dias. Nos JI do gênero *Heterorhabditis* também houve uma relação direta entre infectividade e o percentual de

lipídios (exceto a 8°C), e de forma semelhante, Hass et al. (2002) também relacionaram o declínio da infectividade com a perda da reserva lipídica para esse gênero de nematóide.

A seleção de isolados de NEP já adaptados para uso comercial depende de um detalhado conhecimento de seus atributos fisiológicos e bioquímicos para aumentar sua eficácia. A qualidade e a quantidade de lipídios de JI têm particular importância, pois influenciam criticamente na viabilidade e infectividade dos nematóides (Wright & Perry, 2002).

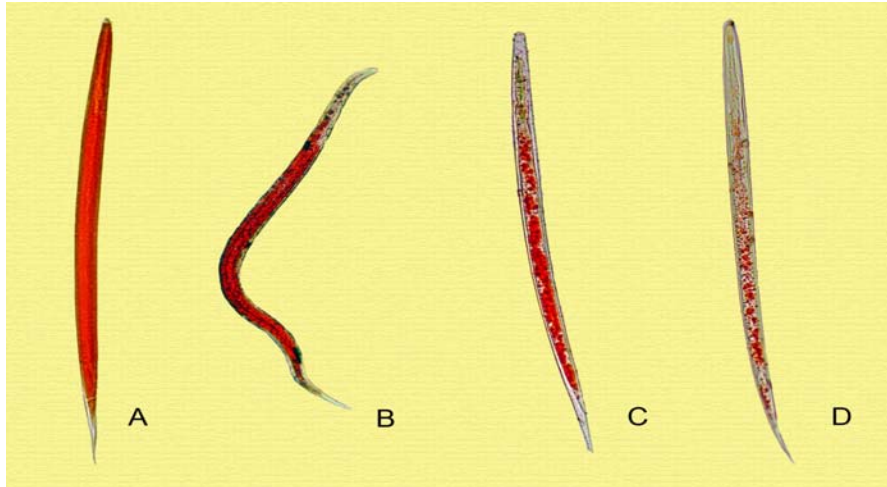


Figura 1. Variações colorimétricas de lipídios, usando o corante “Oil Red O”, em juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. JPM4 em armazenamento sob diferentes temperaturas ao longo do tempo. A. 8°C, 15 dias; B. 8°C, 180 dias; C. 28°C, 15 dias; D. 28°C, 180 dias.

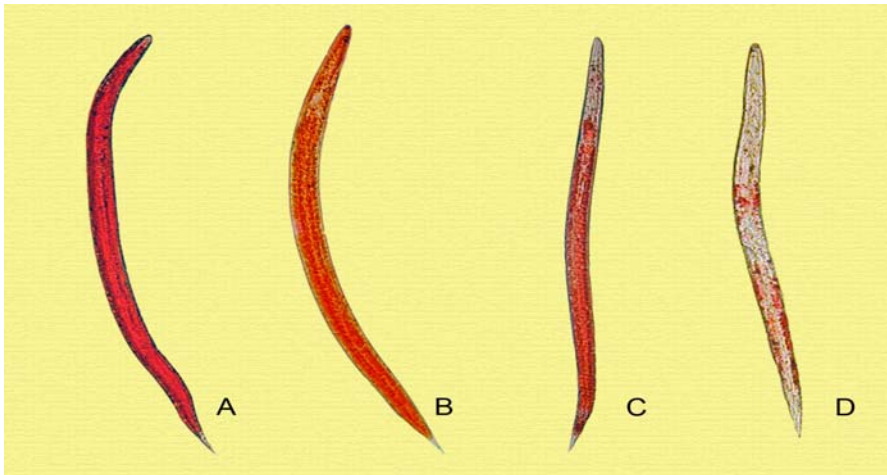


Figura 2. Variações colorimétricas de lipídios, usando o corante “Oil Red O”, em juvenis infectantes de *Steinernema riobrave* em armazenamento sob diferentes temperaturas ao longo do tempo. A. 8°C, 15 dias; B. 8°C, 180 dias; C. 28°C, 15 dias; D. 28°C, 180 dias.

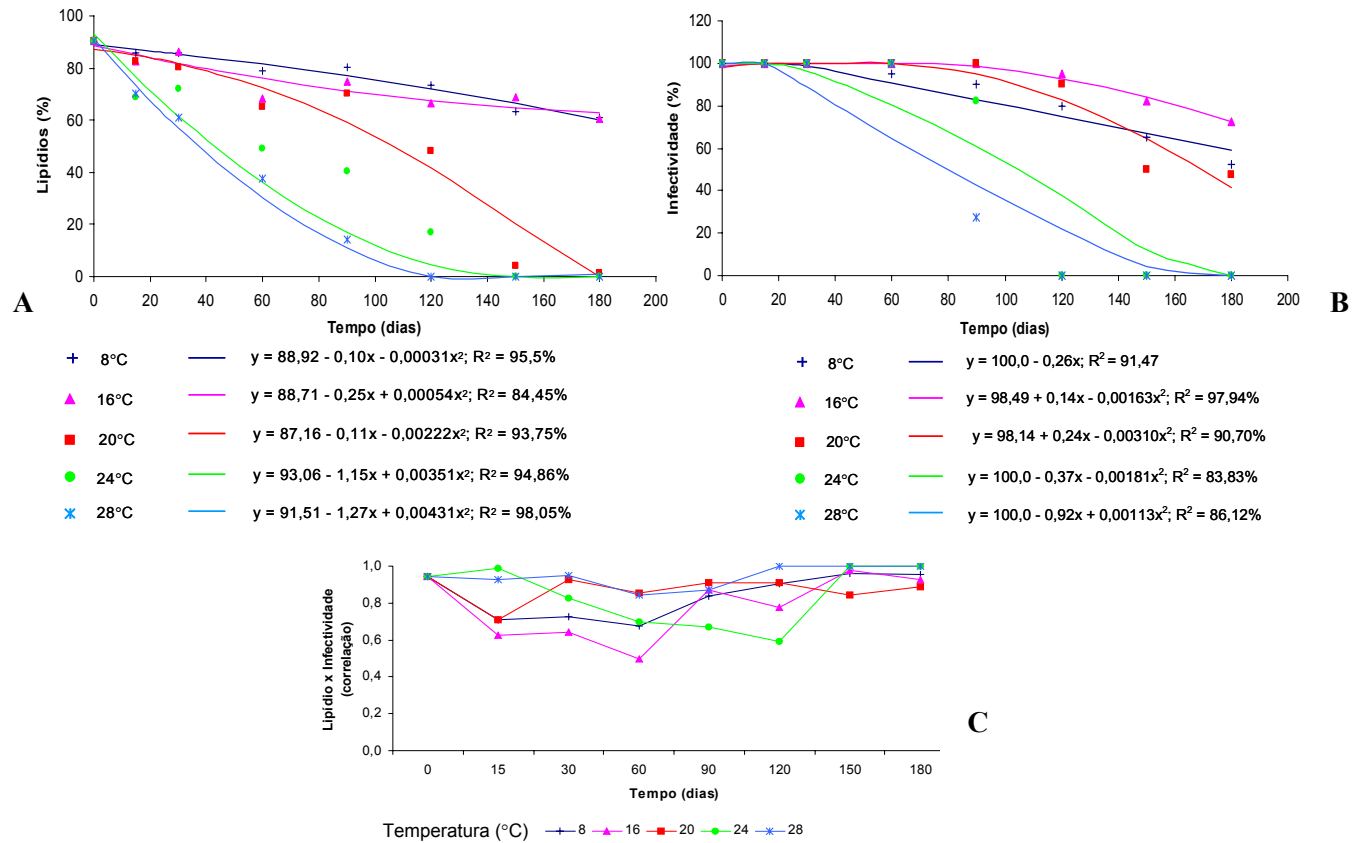


Figura 3. *Steinernema carpocapsae*. A. Lipídio (%) em diferentes temperaturas; B. Infectividade (%) a lagartas de *Galleria mellonella* em diferentes temperaturas; C. Correlação entre percentual de lipídios e infectividade.

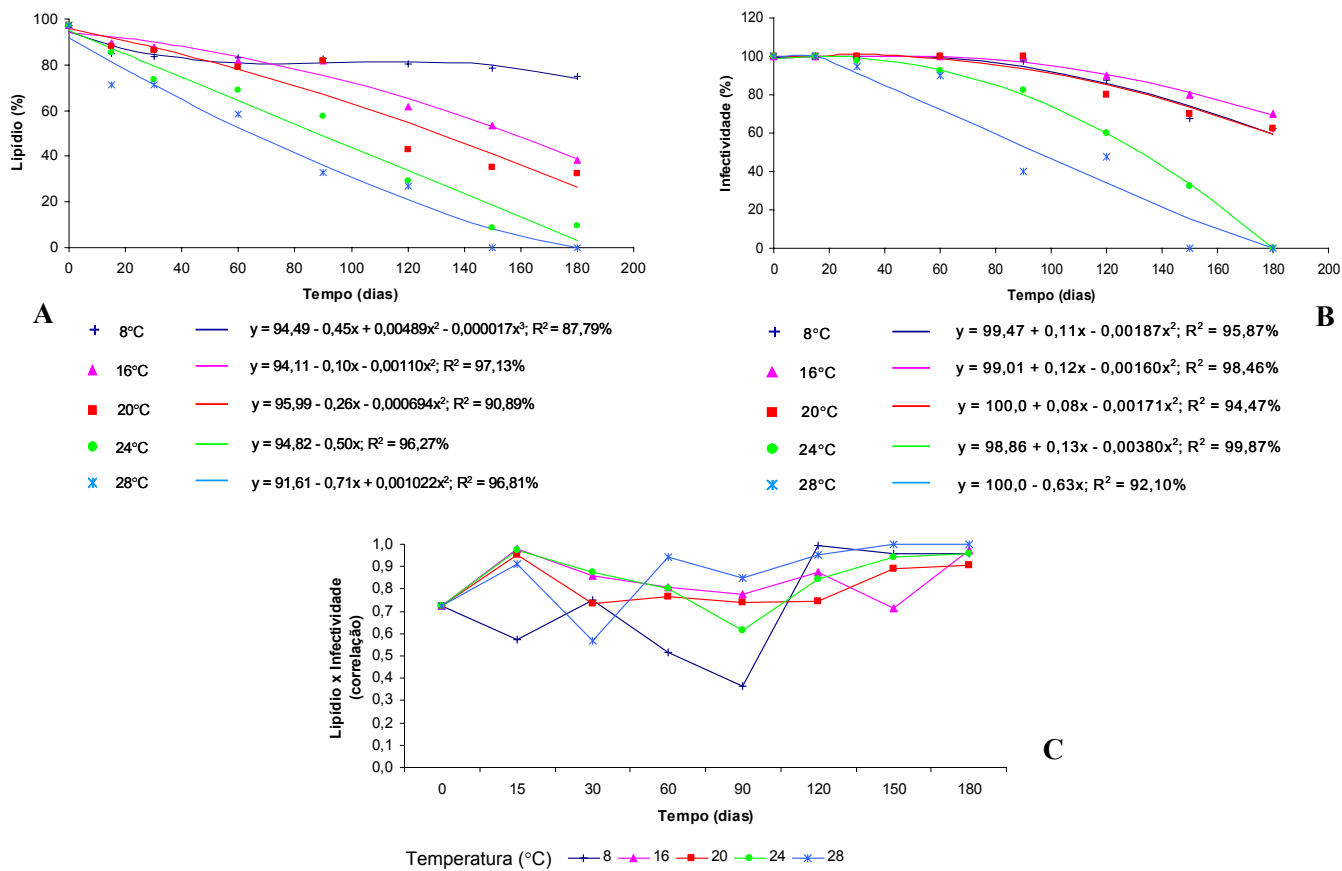


Figura 4. *Steinernema riobrave*. A. Lipídio (%) em diferentes temperaturas; B. Infectividade (%) a lagartas de *Galleria mellonella* em diferentes temperaturas; C. Correlação entre percentual de lipídios e infectividade.

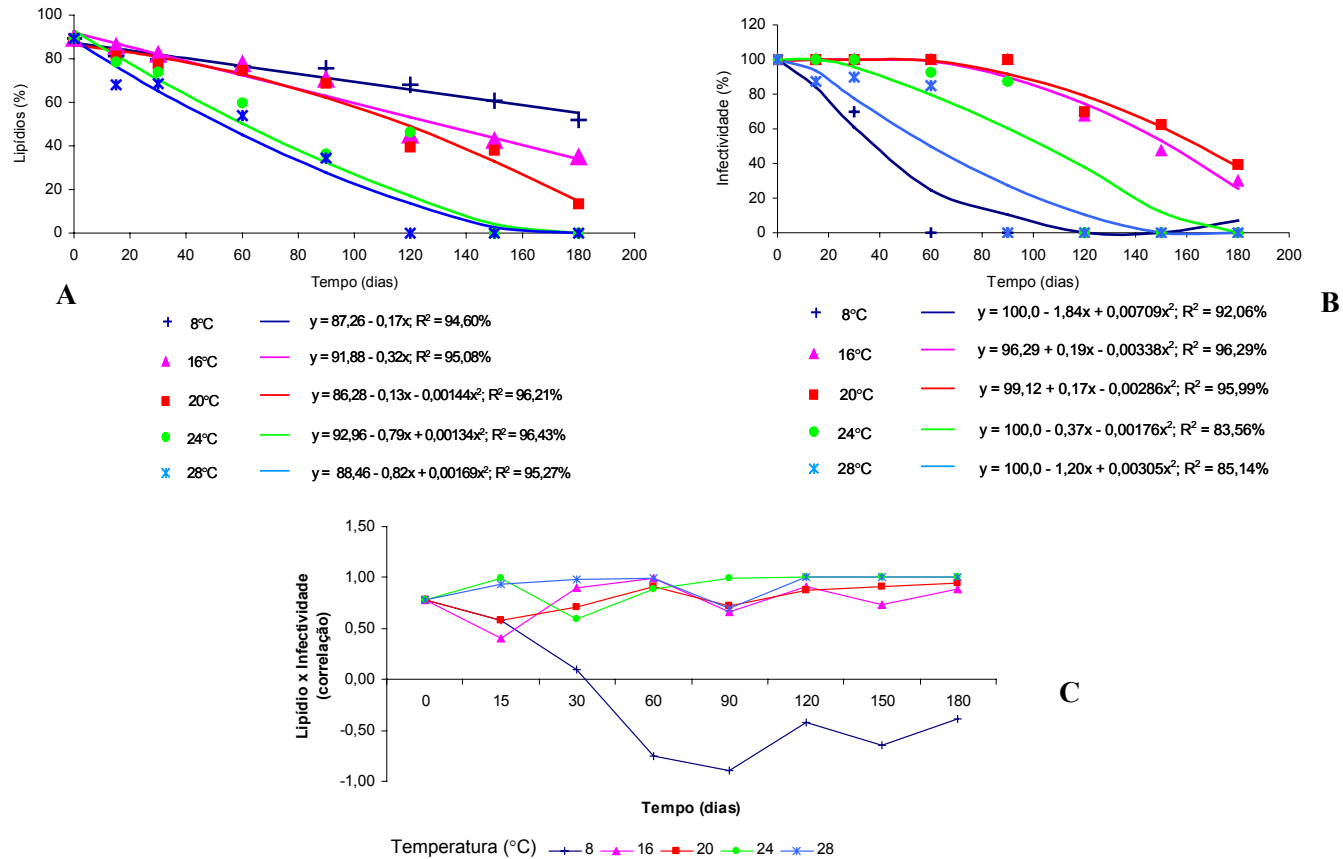


Figura 5. *Heterorhabditis* sp. PI. A. Lipídio (%) em diferentes temperaturas; B. Infectividade (%) a lagartas de *Galleria mellonella* em diferentes temperaturas; C. Correlação entre porcentual de lipídios e infectividade.

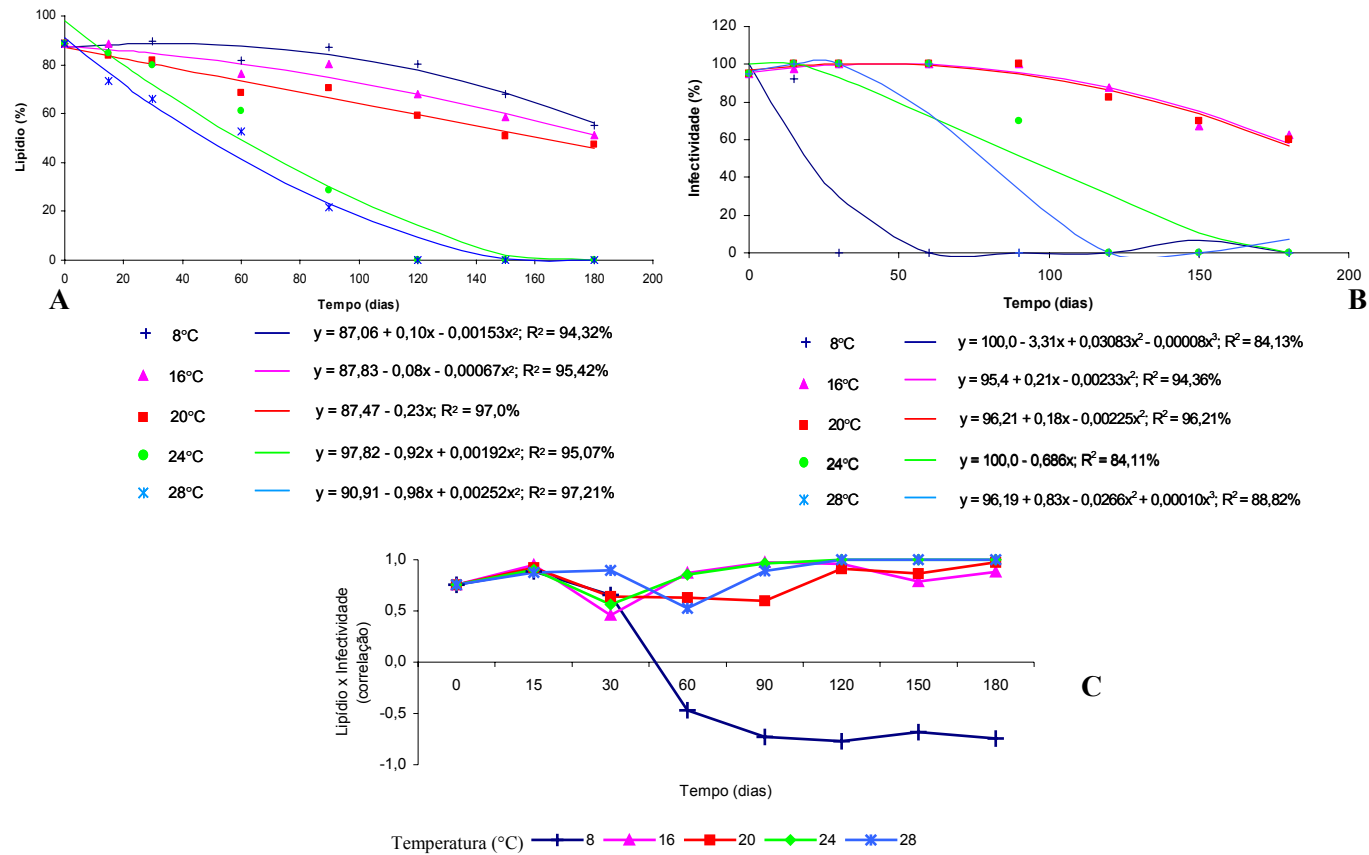


Figura 6. *Heterorhabditis* sp. CCA. A. Lipídio (%) em diferentes temperaturas; B. Infectividade (%) a lagartas de *Galleria mellonella* em diferentes temperaturas; C. Correlação entre porcentual de lipídios e infectividade.

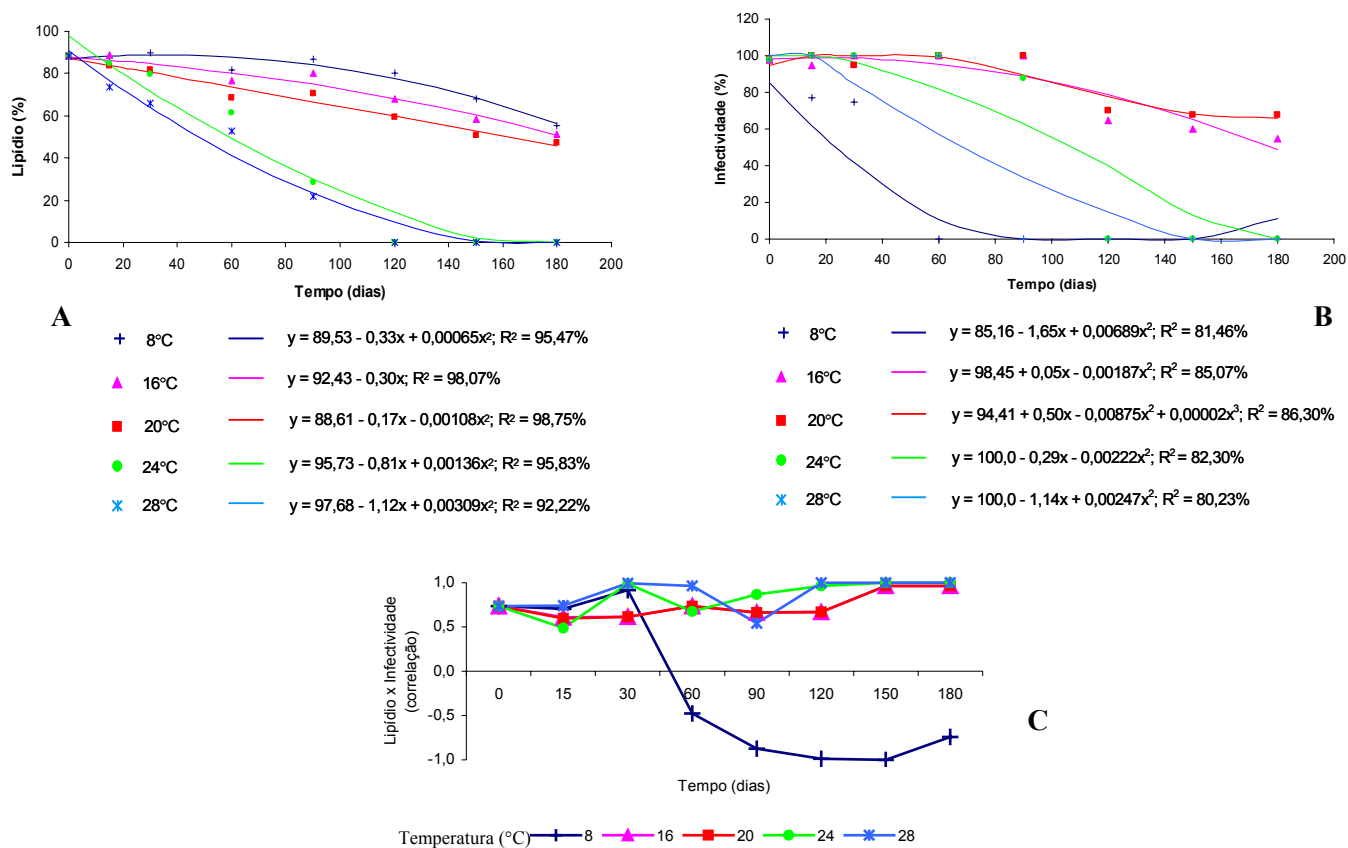


Figura 7. *Heterorhabditis* sp. JPM4. A. Lipídio (%) em diferentes temperaturas; B. Infectividade (%) a lagartas de *Galleria mellonella* em diferentes temperaturas; C. Correlação entre porcentual de lipídios e infectividade.

LITERATURA CITADA

BARRETT, J.; WRIGHT, D. J. Intermediary metabolism. In PERRY, R. N. WRIGHT, D. J. **The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes**. Wallingford: CAB International, 1998. p. 331-353.

BORNSTEIN-FORST, S.; KIGER, H.; RECTOR, A. Impacts of fluctuating temperature on the development and infectivity of entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* A10. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 88, n. 2, p. 147-153, Feb. 2005.

CHITWOOD, D. J. Biosynthesis. In: PERRY, R. N.; WRIGHT, D. J. **The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes**. Wallingford: CAB International, 1998. p. 303-330.

CHRISTOPHERS, A. E. P.; PATEL, M. N.; BENSON, J. A.; SAKA, V. W.; EVANS, A. A. F.; WRIGHT, D. J. A rapid field-laboratory bioassay to assess the infectivity of *Meloidogyne* spp. second stage juveniles. **Nematologica**, Leiden, v. 43, n. 1, p. 117-120, Jan. 1997.

CROLL, N. A. Energy utilization of infective *Ancylostoma tubaeforme* larvae. **Parasitology**, New York, v. 64, n. 6, p. 355-368, June 1972.

DUTKY, S. R.; THOMPSON, J. V.; CANTWE, G. E. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. **Journal of Insect Pathology**, San Diego, v. 6, n. 4, p. 417-422, 1964.

FINNEGAN, M.; DOWNES, M. J.; O'REGAN, M.; GRIFFIN, C. T. Effect of salt and temperature stresses on survival and infectivity of *Heterorhabditis* spp. infectives juveniles. **Nematology**, Leiden, v. 1, n. 1, p. 69-78, Feb. 1999.

FITTERS, P. F. L.; GRIFFIN, C. T. Spontaneous and induced activity of *Heterorhabditis megidis* infective juveniles during storage. **Nematology**, Leiden, v. 6, n. 6, p. 911-917, Nov. 2004.

FITTERS, P.; PATEL, M. N.; GRIFFIN, C. T.; WRIGHT, D. J. Fatty acid composition of *Heterorhabditis* sp. during storage. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 124, n. 1, p. 81-88, Sept. 1999.

FODOR, A.; VECSEI, G.; FARKAS, T. *Caenorhabditis elegans* as a model for the study of entomopathogenic nematodes. In: GAUGLER R.; KAYA, H. **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 249-270.

GLAZER, I.; SALAME, L. Osmotic survival of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. **Biological Control**, San Diego, v. 18, n. 3, p. 251-257, July 2000.

GREWAL, P. S. Anhydrobiotic potential and long-term storage of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 14, p. 995-1000, Dec. 2000.

GREWAL, P. S.; NARDO, E. A. B. de; AGUILLERA, M. Entomopathogenic nematodes: Potential for exploration and use in South America. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 191-205, Apr./June 2001.

HASS, B.; DOWNES, M. J.; GRIFFIN, C. T. Persistence of four *Heterorhabditis* spp. isolates in soil: role of lipid reserves. **Journal of Nematology**, v. 34, n. 2, p. 151-158, June 2002.

HATAB, M. A.; GAUGLER, R. Lipids of in vitro cultured *Heterorhabditis bacteriophora*. **Biological Control**, San Diego, v. 15, n. 3, p. 113-118, July 1999.

JAGDALE, G. B.; GREWAL, P. S. Acclimation of entomopathogenic nematodes to novel temperatures: trehalose accumulation and the acquisition of thermotolerance. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 145-152, Feb. 2003.

LEE, D. L. The distribution of glycogen and fat in *Thelastoma bulhõesi* (Magalhães, 1900), a nematode parasitic in cockroaches. **Parasitology**, New York, v. 50, n. 1/2, p. 247-259, 1960.

LEE, D. L.; ATKINSON, H. J. **Physiology of nematodes**. New York: Columbia University, 1977. 215 p.

LEWIS, E. E.; SELVAN, S.; CAMPBELL, J. F.; GAUGLER, R. Changes in foraging behaviour during the infective stages of entomopathogenic nematodes. **Parasitology**, New York, v. 110, n. 5, p. 583-590, June 1995.

MENTI, H.; PATEL, M. N.; WRIGHT, D. J.; PERRY, R. N. Lipid utilisation during storage of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis megidis* from Greece and the UK. **Nematology**, Leiden, v. 5, n. 1, p. 31-37, 2003.

MOLINA J. P.; LÓPEZ N. J. C. Producción in vivo de tres entomonematodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. **Revista Colombiana de Entomología**, Bogotá, v. 27, n. 1-2, p. 73-78, 2001.

PARRA, J. R. P. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 1015-1037.

PATEL, M. N.; STOLINSKI, M.; WRIGHT, D. J. Neutral lipids and the assessment of infectivity in entomopathogenic nematodes: observations on four *Steinernema* species. **Parasitology**, New York, v. 114, n. 6, p. 489-496, June 1997.

QIU, L.; BEDDING, R. A. Energy metabolism and survival of the infective juveniles of *Steinernema carpocapsae* under oxygen-deficient conditions. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 32, n. 3, p. 271-280, Sept. 2000.

SERWE-RODRIGUEZ, J.; SONNENBERG, K.; APPLEMAN, B.; BORNSTEIN-FORST, S. Effects of in host desiccation on development, survival, and infectivity of entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 85, n. 3, p. 175-181, Mar. 2004.

STAMPS, T. W.; LINIT, M. J. A rapid and simple method for staining lipid in fixed nematodes. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 27, n. 2, p. 244-247, June 1995.

STOREY, R. M. J. The initial neutral lipid reserves of juveniles of *Globodera* spp. **Nematologica**, Leiden, v. 29, n. 2, p. 144-150, June 1983.

VAN GUNDY, S. D. Ecology of *Meloidogyne* spp.-emphasis on environmental factors affecting survival and pathogenicity. In: SASSER, J. N.; CARTER, C. C. **An advanced treatise on Meloidogyne**. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1985. p. 177-182.

WHITE, G. F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, Washington, v. 66, p. 302-303, 1927.

WRIGHT, D. J.; GREWAL, P. S.; STOLINSKI, M. Relative importance of neutral lipids and glycogen as energy stores in dauer larvae of two entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema feltiae*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 118, n. 2, p. 269-273, Oct. 1997.

WRIGHT, D. J.; PERRY, R. N. Physiology and biochemistry. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 145-168.

ARTIGO 5

Avaliação de substâncias com potencial conservante no armazenamento de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) (Preparado de acordo com as normas da revista “Arquivos do Instituto Biológico”)

VANESSA ANDALÓ¹

RICARDO S. CAVALCANTI¹

JUAN PABLO MOLINA AZEVEDO²

ALCIDES MOINO JR¹

¹Departamento de Entomologia - UFLA, C.P. 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG.

²CCTA/LPP (UENF), Av. Alberto Lamego 2000, CEP 28015-620, Campos dos Goytacazes, RJ.

Avaliação de substâncias com potencial conservante no armazenamento de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae)

Resumo

Foi avaliado o uso de diferentes substâncias com potencial conservante no armazenamento dos nematóides entomopatogênicos *Steinernema carpocapsae* A11 e *Heterorhabditis* sp. JPM4. Os nematóides foram mantidos em água destilada (testemunha), sendo os demais tratamentos compostos por água adicionada de: Tween 80[®] (0,1%), etileno glicol (0,1%), glicerina (1%), glicose (1%), CaCO₃ (0,1%), Triton[®] (0,1%), KMnO₄ (0,01%) e NaOCl (0,1%). As avaliações foram realizadas aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, por meio de contagens dos juvenis infectantes (JI), sendo determinada a sua viabilidade e infectividade. Obteve-se que a glicerina agiu como substância conservante na temperatura de 28°C para os dois nematóides testados e também a 16°C para o nematóide *S. carpocapsae* A11. As demais substâncias usadas, mesmo quando mantiveram os nematóides vivos, não preservaram a infectividade.

Palavras-chave: *Heterorhabditis*, *Steinernema*, controle biológico, persistência, sobrevivência.

Evaluation of potential preserving substances to storage entomopathogenic
nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae)

Summary

The use of different substances to storage the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* A11 e *Heterorhabditis* sp. JPM4 was evaluated. The nematodes were kept in distilled water (control) and the other treatments were made of water added by: Tween 80[®] (0.1%), etileno glicol (0.1%), glicerina (1%), glicose (1%), CaCO₃ (0.1%), Triton[®] (0,1%), KMnO₄ (0.01%) and NaOCl (0.1%). The evaluations were made at 30, 60, 90, 120, 150 and 180 days, counting number of infective juveniles (IJ) and determining their survival and infectivity. It was obtained that glycerin acted as preserving substance in the temperature of 28°C for both nematodes and also in 16°C for *S. carpocapsae* A11. The other substances tested, even when kept the nematodes alive, didn't show this effect in relation to infectivity.

Keywords: *Heterorhabditis*, *Steinernema*, biological control, persistence, survival

Introdução

Diversas espécies de nematóides entomopatogênicos (NEP) são estudadas para produção massal e uso em programas de controle biológico de pragas. No entanto, a sobrevivência dos NEP tem sido muito discutida, uma vez que em condições de laboratório tem ocorrido alta mortalidade em função do tempo de armazenamento (Glazer, 2002; Hatab & Gaugler, 2001).

Os NEP são compatíveis com muitos produtos fitossanitários e apresentam sinergismo com outros agentes entomopatogênicos, possibilitando o uso em programas de manejo integrado de pragas e aumentando a eficiência e a economia do método utilizado. A associação mutualística com bactérias (gênero *Xenorhabdus* em Steinernematidae e gênero *Photorhabdus* em Heterorhabditidae) resulta em morte rápida dos insetos parasitados (Ferraz, 1998).

Os nematóides no terceiro estágio infectante (JI) podem viver livremente, procurando o hábitat do solo para buscar um hospedeiro suscetível. Uma vez infectando um inseto hospedeiro, os nematóides liberam sua bactéria simbiote, a qual, em combinação com toxinas produzidas pelos nematóides, mata o hospedeiro em 24 a 48 horas. Os nematóides geralmente passam duas gerações dentro do hospedeiro em um período de dez dias, dependendo da temperatura e da concentração de inóculo (Adams & Nguyen, 2002).

As estratégias usadas pelos NEP para sobreviver em condições adversas (dessecação, congelamento, radiação ultravioleta, doenças e predação) são pouco conhecidas, podendo estar relacionadas com o processo de quiescência, migração ou permanência no cadáver dos insetos por períodos extensos, porém existem diferenças entre as condições ideais para cada espécie (Westerman, 1999). Assim, o estudo dos parâmetros que influenciam a sobrevivência dos NEP é um aspecto importante para sua liberação no campo, a fim de manter a qualidade do inóculo (Brown & Gaugler, 1997).

A glicerina é comumente usada como um crioprotetor e remove osmoticamente a água do corpo do nematóide. A cutícula não é permeável o suficiente para permitir que a glicerina entre no corpo, reduzindo os danos na membrana das células. A glicerina tem sido usado na técnica de criopreservação, na qual os nematóides são submetidos à temperatura de -130°C , em nitrogênio líquido, com a finalidade de minimizar a formação de cristais intracelulares e intercelulares (Glazer, 2002; Kaya & Stock, 1997; Lewis & Shapiro-Ilan, 2002).

Brown & Gaugler (1997) obtiveram sobrevivência significativamente aumentada para nematóides congelados em glicerina a 20% em comparação com o congelamento usando apenas água. De acordo com Hatab & Gaugler (1999), no processo de produção massal *in vitro* do nematóide *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1975, podem ser usados óleo de oliva ou óleo de canola como conservantes, pois agem como proteção para a cutícula do nematóide.

O hipoclorito de sódio a 1% pode ser usado como uma solução desinfetante para limpeza de nematóides, após coleta em produção *in vivo*, com posterior enxágüe em água por cerca de 5 a 10 minutos (Gaugler et al., 2002).

O uso de substâncias conservantes pode auxiliar na manutenção da viabilidade desses nematóides, prolongando a sua sobrevivência. Desta forma, esse trabalho teve como objetivo avaliar o uso de diferentes substâncias com potencial conservante para duas espécies de NEP durante o período de armazenamento.

Material e Métodos

1. Multiplicação e manutenção dos nematóides entomopatogênicos

Os nematóides *Steinernema carpocapsae* A11 (Weiser, 1955) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding 1982 e *Heterorhabditis* sp. JPM4 foram cultivados no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil. Estes foram mantidos em frascos Erlenmeyer em câmara climática do tipo BOD, com temperatura de $16 \pm 1^\circ\text{C}$, em suspensão aquosa de 500 a 1.000 JI/mL.

Para a multiplicação dos nematóides foram utilizadas lagartas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae), criadas no Laboratório de Patologia de Insetos de acordo com metodologia descrita por Dutky et al. (1964), utilizando dieta artificial modificada por Parra (1998).

Dez lagartas do último ínstar de *G. mellonella* foram transferidas para placas de Petri com 9 cm de diâmetro, contendo papel filtro no seu interior, para multiplicação das duas espécies de NEP utilizadas neste estudo. Simultaneamente foi adicionado 1mL de suspensão aquosa dos nematóides na concentração de 20 JI/lagarta. As placas foram mantidas em câmara BOD por 72h, em temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e escotofase de 24h. Após confirmação da sintomatologia da morte das lagartas, estas foram transferidas para câmara seca (Molina & López, 2001) por 4 dias.

Após este período, as lagartas foram transferidas para armadilhas modificadas de White (White, 1927) para serem coletados os JI dos nematóides. As armadilhas foram mantidas em BOD por um período de 3 a 7 dias. A suspensão de nematóides recolhida diariamente foi transferida para provetas com capacidade de 1.000 mL, contendo 800 mL de água destilada, para que os JI decantassem por 24 h. Este processo de decantação teve a finalidade de separar nematóides adultos e corpos gordurosos do inseto dos JI. Na proveta foi também adicionado o espalhante adesivo Tween 80[®] a 0,1%. Depois de realizado o processo de purificação dos nematóides foram feitas a diluição e a quantificação da suspensão de nematóides em placas plásticas para testes serológicos (“Elisa”) em microscópio estereoscópico.

2. Viabilidade e patogenicidade de nematóides entomopatogênicos após armazenamento com substâncias com potencial conservante

Os nematóides *S. carpocapsae* A11 e *Heterorhabditis* sp. JPM4 foram mantidos em diferentes substâncias consideradas potenciais para melhor conservação em armazenamento. Utilizaram-se os produtos Triton X-100[®] (0,1%), glicerina (1%), KMnO₄ (0,01%), Tween 80[®] (0,1%), etileno glicol (0,1%), glicose (1%), CaCO₃ (0,1%) e NaOCl (0,1%), os quais foram adicionados às suspensões desses nematóides. No tratamento testemunha foi adicionada apenas água destilada.

As suspensões dos nematóides foram incubadas por 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias em água parada nas temperaturas de 8, 16 e 28°C, com 24 h de escotofase, concentração de 3.000 JI/mL e 5 repetições por tratamento. Foram utilizados copos plásticos de 110 mL com tampa, de acordo com os tratamentos e repetições, com 40 mL de suspensão para cada repetição. As tampas foram perfuradas, deixando um orifício de aproximadamente 2 cm de diâmetro para possibilitar aeração. A porcentagem de viabilidade foi obtida contando-se o número de nematóides vivos e mortos. Uma alíquota de 0,1 mL da suspensão de cada repetição foi colocada em placa de poliestireno para testes serológicos e a contagem foi realizada com auxílio de um microscópio estereoscópico. Antes da retirada das alíquotas das suspensões para as avaliações, estas foram agitadas a fim de homogeneizá-las. No teste de patogenicidade, cinco lagartas de

G. mellonella foram colocadas em uma placa de Petri (5 cm) com papel filtro no fundo. Uma alíquota de 0,2 mL de cada suspensão foi retirada e aplicada por placa. Estas placas foram colocadas em BOD, com temperatura controlada de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e, após 3 dias, foi avaliada a porcentagem de mortalidade das lagartas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao Teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) para comparação entre as médias para as substâncias conservantes e à análise de regressão para avaliação do efeito do tempo de armazenamento.

Resultados e Discussão

1. Viabilidade de juvenis infectantes de nematóides entomopatogênicos armazenados em suspensão aquosa com substâncias com potencial conservante

As diferenças na sobrevivência de JI armazenados em água juntamente com diferentes substâncias com potencial conservante durante 180 dias ocorreram tanto para *S. carpocapsae* A11 como para *Heterorhabditis* sp. JPM4; porém, cada espécie se comportou de forma diferente em relação à substância utilizada e à temperatura de armazenamento (Figuras 1 e 2; Tabelas 1 e 2).

Ocorreu redução na sobrevivência dos JI ao longo do tempo para os dois nematóides testados, nas temperaturas de 8°C , 16°C e 28°C , em todos os tratamentos, porém a 28°C o efeito da ação das substâncias utilizadas foi maior quando comparado com o tratamento testemunha (Figuras 1 e 2).

Para *S. carpocapsae* A11 ocorreu redução acentuada na sobrevivência a partir dos 60 dias de armazenamento na temperatura de 28°C; todavia, no tratamento com glicerina a sobrevivência dos JI foi diminuindo gradativamente ao longo do tempo. O mesmo ocorreu na temperatura de 16°C, de forma menos acentuada. Para a temperatura de 8°C, o uso de substâncias para prolongar a sobrevivência dos JI não foi eficaz, com curvas de regressão similares e sobrevivência da testemunha maior do que a dos demais tratamentos (Figura 1).

Quando se utilizou 8°C, houve diferença significativa entre os tratamentos a partir de 120 dias; no entanto, aos 180 dias apenas a testemunha e o tratamento glicerina proporcionaram sobrevivência maior, sem diferença entre si, evidenciando que não houve melhoria na condição de armazenamento nessa temperatura (Tabela 1). A 16°C houve diferença entre os tratamentos desde o princípio das avaliações, e aos 180 dias o tratamento glicerina diferiu dos demais, mantendo maior a sobrevivência dos JI.

Aos 28°C a maioria dos tratamentos não apresentou nematóides vivos a partir dos 90 dias, exceto os tratamentos glicerina e etileno glicol; aos 120 dias apenas o tratamento com glicerina apresentava JI vivos, o que foi observado até a última avaliação. Apesar de a porcentagem de sobrevivência final ter sido baixa aos 28°C, essa diferiu dos demais tratamentos, mostrando que a adição de glicerina prolongou o período de sobrevivência desses nematóides para essa temperatura e também na temperatura de 16°C (Tabela 1).

Para *Heterorhabditis* sp. JPM4 houve redução acentuada na sobrevivência aos 60 dias a 8°C para todos os tratamentos. O tratamento em que se empregou NaOCl causou mortalidade dos JI, sendo que aos 60 dias não havia nematóides vivos nas três temperaturas testadas. Quando em 16°C, as curvas de regressão foram similares, exceto para NaOCl, com redução acentuada da sobrevivência (Figura 2). A 28°C o tratamento com glicerina teve a sobrevivência diminuída mais lentamente que para os demais tratamentos, pois enquanto aos 120 dias os demais tratamentos quase não tinham mais JI vivos, o tratamento com glicerina ainda apresentava mais de 50% de sobrevivência (Figura 2).

Quando em 8°C, houve diferença entre os tratamentos somente na avaliação com 30 dias; no entanto, a testemunha, Tween[®] e Triton[®] foram os que proporcionaram maior sobrevivência, não havendo diferença entre eles, sem melhoria na condição de armazenamento nessa temperatura. A partir de 60 dias, nessa temperatura, não foram encontrados nematóides vivos (Tabela 2).

A 16°C houve diferença entre os tratamentos em todas avaliações; contudo, não houve diferença entre a testemunha e os demais tratamentos aos 180 dias, exceto pelos tratamentos com NaOCl e glicose, que apresentaram porcentagem de sobrevivência menor. Aos 28°C os tratamentos glicerina, seguidos por etileno glicol e Tween[®], mantiveram índices maiores de

sobrevivência, diferindo da testemunha e dos demais tratamentos aos 90 dias de armazenamento (Tabela 2).

Com 120 e 150 dias, apenas o tratamento glicerina manteve os nematóides vivos, e aos 180 dias estes não foram mais encontrados. Apesar de os JI terem morrido ao final dos 180 dias, observou-se que a sobrevivência foi prolongada quando usada glicerina na temperatura de 28°C para *Heterorhabditis* sp. JPM4 (Tabela 2).

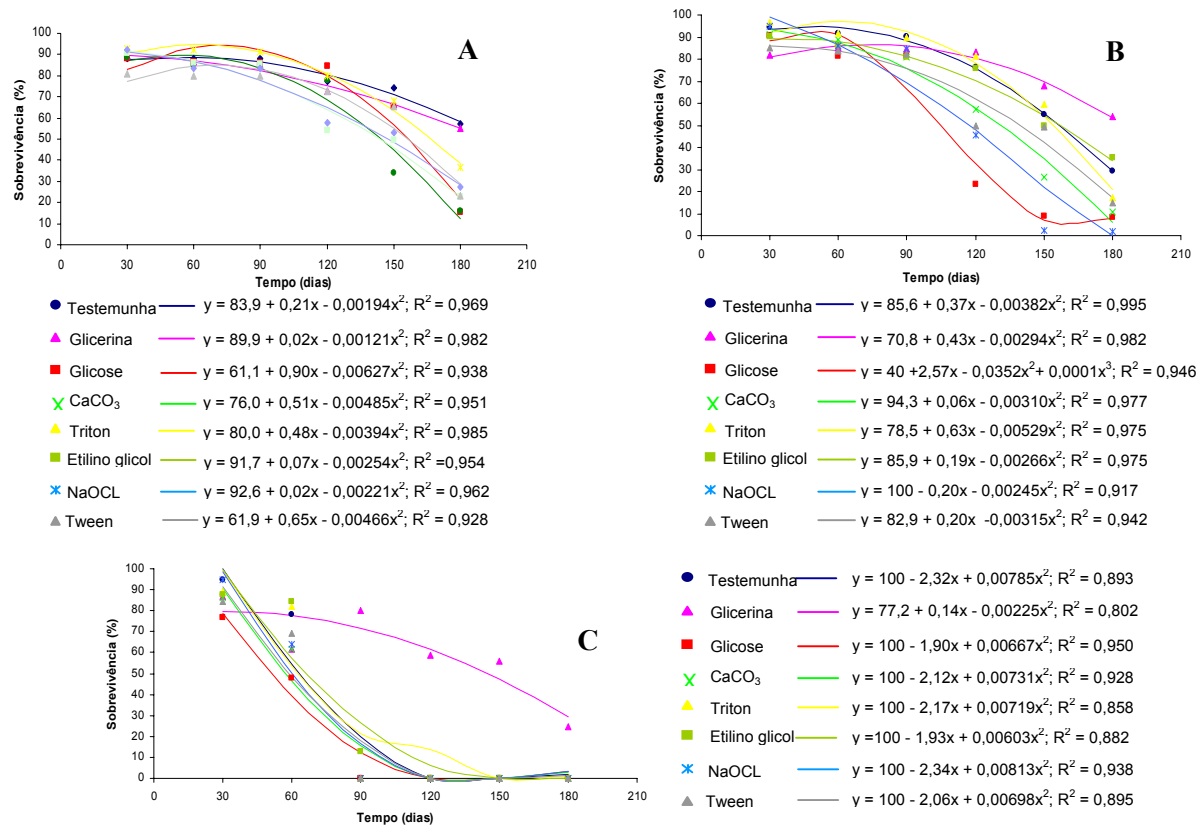


Figura 1. Efeito do tempo na sobrevivência (%) de juvenis infectantes de *Steinernema carpocapsae* A11 mantidos em suspensão aquosa com substâncias conservantes, em três temperaturas. A: 8°C, B: 16°C e C: 28°C.

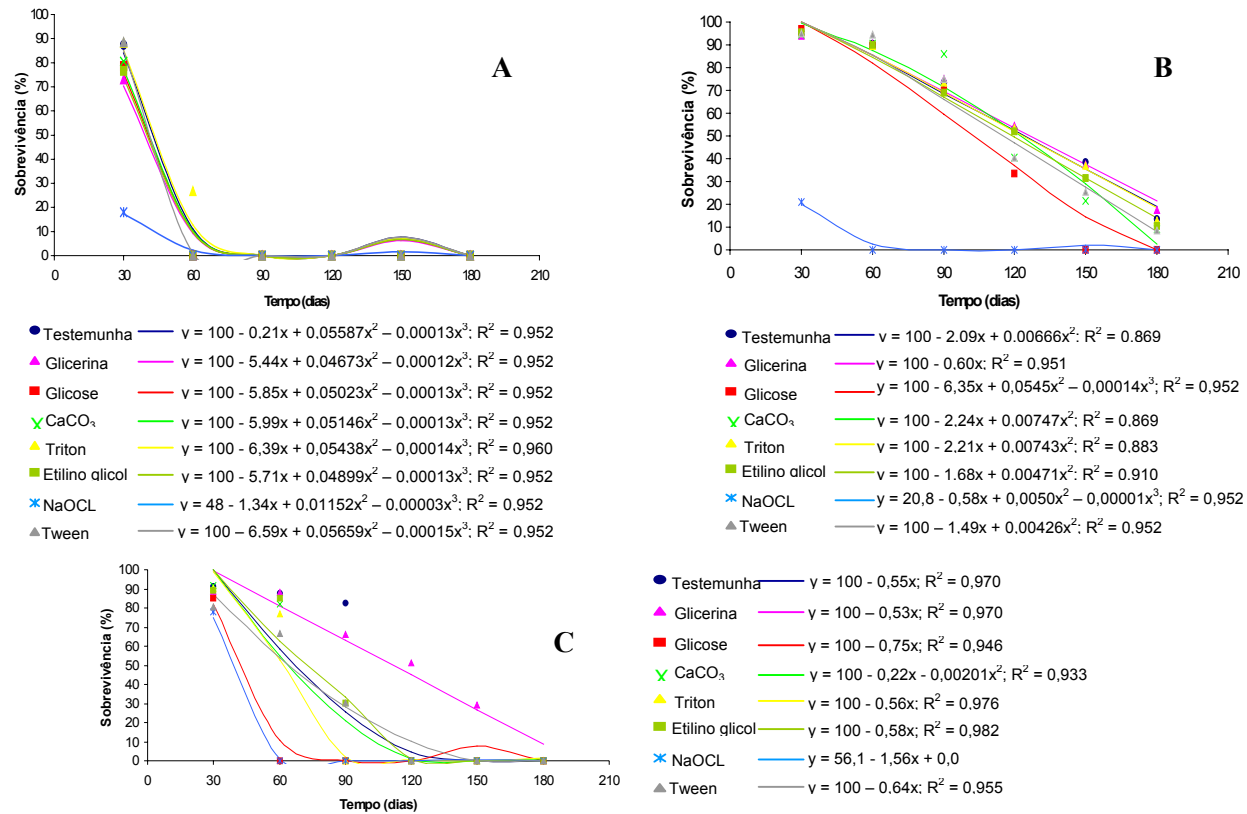


Figura 2. Efeito do tempo na sobrevivência (%) de juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. JPM4 mantidos em suspensão aquosa com substâncias conservantes, em três temperaturas. A: 8°C, B: 16°C e C: 28°C.

Tabela 1. Efeito de substâncias com potencial conservante na sobrevivência (%) de juvenis infectantes de *Steinernema carpocapsae* A11 mantidos em suspensão aquosa, em três temperaturas, ao longo do tempo.

Tempo (dias)	Temperatura (°C)	Testemunha*	Triton	Glicerina	CaCO ₃	NaOCl	Etileno glicol	Glicose	Tween
30	8	88,2 ± 1,4 a	92,5 ± 1,6 a	89,3 ± 1,5 a	88,8 ± 1,2 a	92,0 ± 1,0 a	90,9 ± 0,5a	88,1 ± 2,3 a	81,1 ± 1,6 a
	16	94,6 ± 3,9 a	96,8 ± 1,6 a	81,8 ± 1,6 b	91,2 ± 1,2 a	95,1 ± 0,8 a	90,0 ± 0,7 a	90,8 ± 1,8 a	85,2 ± 2,6 b
	28	94,6 ± 1,4 a	88,9 ± 2,4 b	86,8 ± 1,5 b	86,0 ± 1,5 b	94,8 ± 2,8 a	87,6 ± 1,1 b	76,8 ± 3,4 c	84,3 ± 3,0 b
60	8	87,9 ± 1,1 a	92,2 ± 1,3 a	86,7 ± 2,1 a	85,2 ± 1,2 a	83,7 ± 0,9 a	85,9 ± 1,6a	86,7 ± 2,1 a	80,0 ± 1,8 a
	16	91,4 ± 1,6 a	91,4 ± 1,3 a	85,2 ± 2,2 a	88,6 ± 1,2 a	86,2 ± 2,8 a	85,8 ± 2,3 a	81,2 ± 1,7 a	83,8 ± 1,6 a
	28	78,3 ± 1,9 a	82,0 ± 2,1 a	61,4 ± 1,5 c	61,4 ± 1,5 c	64,1 ± 4,9 c	84,4 ± 4,8 a	48,0 ± 5,6 d	69,3 ± 4,1 b
90	8	88,2 ± 1,1 a	91,0 ± 0,7 a	85,0 ± 2,2 a	84,3 ± 1,6 a	83,4 ± 1,4 a	85,7 ± 1,7 a	86,0 ± 1,3 a	80,1 ± 1,5 a
	16	90,4 ± 1,1 a	89,7 ± 1,6 a	84,6 ± 3,0 b	80,9 ± 2,2 b	84,6 ± 1,4 b	80,7 ± 2,3 b	81,2 ± 1,4 b	82,2 ± 2,9 b
	28	0,0 ± 0,0 c	0,0 ± 0,0 c	79,8 ± 1,2 a	0,0 ± 0,0 c	0,0 ± 0,0 c	12,6 ± 3,7 b	0,0 ± 0,0 c	0,0 ± 0,0 c
120	8	77,5 ± 1,3 a	79,8 ± 2,0 a	72,5 ± 6,1 b	77,8 ± 2,9 a	79,0 ± 8,5 c	54,4 ± 6,0 c	84,4 ± 1,5 a	72,4 ± 2,0 b
	16	76,3 ± 2,4 a	81,5 ± 2,1 a	83,3 ± 1,9 a	57,1 ± 2,2 b	45,5 ± 5,6 c	75,7 ± 1,9 a	23,0 ± 2,2 d	50,6 ± 3,5 c
	28	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	58,9 ± 5,3 a	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b
150	8	74,1 ± 2,9a	67,9 ± 1,2 a	66,7 ± 2,7 a	34,0 ± 3,1 c	53,2 ± 0,5 b	49,3 ± 1,8b	65,6 ± 3,9 a	65,4 ± 1,6 a
	16	55,0 ± 4,7 c	59,6 ± 4,8 b	67,8 ± 0,9 a	26,5 ± 3,4 d	2,22 ± 2,2 e	49,6 ± 5,3c	9,0 ± 5,6 e	49,2 ± 3,7 c
	28	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	55,8 ± 1,3 a	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b
180	8	57,1 ± 1,7 a	36,5 ± 1,8 b	55,3 ± 1,5 a	15,9 ± 2,3 e	27,1 ± 4,5 c	22,6 ± 3,3 d	15,5 ± 1,9 e	23,1 ± 3,0 d
	16	29,5 ± 3,7b	17,0 ± 2,6 c	53,7 ± 1,0 a	10,8 ± 1,7 c	2,0 ± 2,0 d	35,3 ± 5,0 b	8,2 ± 2,0d	15,9 ± 1,4 c
	28	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	24,7 ± 2,3 a	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b

*Médias seguidas por letras distintas nas linhas dentro de cada tempo diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P < 0,05).

M ± EP (M)

Tabela 2. Efeito de substâncias com potencial conservante na sobrevivência (%) de juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. JPM4 mantidos em suspensão aquosa, em três temperaturas, ao longo do tempo.

Tempo (dias)	Temperatura (°C)	Testemunha*	Triton	Glicerina	CaCO ₃	NaOCl	Etileno glicol	Glicose	Tween
30	8	87,4 ± 2,1 a	88,3 ± 1,9 a	73,1 ± 4,7 c	80,5 ± 3,6 b	18,0 ± 1,0 d	76,6 ± 2,9 b	78,6 ± 3,3 b	88,5 ± 1,5 a
	16	94,3 ± 0,7 a	95,5 ± 1,2 a	93,8 ± 2,3 a	94,6 ± 0,9 a	21,0 ± 1,9 b	95,4 ± 1,7 a	96,8 ± 1,3 a	95,1 ± 1,4 a
	28	91,3 ± 1,3 a	90,3 ± 0,5 a	88,8 ± 2,0 a	91,7 ± 0,9 a	7,8 ± 2,3 c	89,1 ± 0,7 a	85,3 ± 3,6 b	80,5 ± 3,2 b
60	8	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a
	16	90,3 ± 1,1 a	89,6 ± 1,5 a	90,6 ± 1,4 a	90,3 ± 0,7 a	0,0 ± 0,0 b	90,0 ± 2,2 a	89,4 ± 1,8 a	94,7 ± 1,5 a
	28	87,6 ± 1,8 a	77,1 ± 3,2 b	88,3 ± 2,1 a	81,7 ± 2,7 b	0,0 ± 0,0 d	85,3 ± 0,7 a	0,0 ± 0,0 d	66,1 ± 3,5 c
90	8	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a
	16	73,6 ± 2,1 b	73,5 ± 3,3 b	75,6 ± 3,5 b	86,2 ± 0,8 a	0,0 ± 0,0 c	68,9 ± 3,5 b	69,8 ± 1,5 b	75,0 ± 3,5 b
	28	8,2 ± 3,9 c	0,0 ± 0,0 d	66,1 ± 5,7 a	0,0 ± 0,0 d	0,0 ± 0,0 d	30,6 ± 3,9 b	0,0 ± 0,0 d	30,4 ± 5,9 b
120	8	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a
	16	53,0 ± 0,9 a	53,6 ± 4,2 a	54,5 ± 5,3 a	40,5 ± 6,5 b	0,0 ± 0,0 c	52,2 ± 4,1 a	33,4 ± 2,7 b	40,4 ± 5,5 b
	28	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	51,1 ± 1,9 a	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b
150	8	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a
	16	38,5 ± 2,9 a	37,1 ± 3,3 a	37,7 ± 4,5 a	21,4 ± 2,3 b	0,0 ± 0,0 c	31,3 ± 3,6 a	0,0 ± 0,0 c	25,5 ± 2,9 b
	28	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	29,5 ± 3,6 a	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b
180	8	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a
	16	13,5 ± 1,9 a	13,1 ± 0,9 a	17,3 ± 2,1 a	8,9 ± 1,3 a	0,0 ± 0,0 b	10,7 ± 2,1 a	0,0 ± 0,0 b	8,4 ± 1,5 a
	28	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a

*Médias seguidas por letras distintas nas linhas dentro de cada tempo diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P < 0,05).

M ± EP (M)

2. Infectividade de juvenis infectantes de nematóides entomopatogênicos a lagartas de *Galleria mellonella* quando armazenados em suspensão aquosa com diferentes substâncias com potencial conservante.

Os resultados obtidos evidenciaram diferenças na infectividade dos JI quando armazenados em água junto com as diferentes substâncias durante o período de armazenamento de 180 dias. As diferenças ocorreram tanto para *S. carpocapsae* A11 como para *Heterorhabditis* sp. JPM4; entretanto, cada nematóide se comportou de forma diferente em relação à substância utilizada e à temperatura em que foram mantidos (Figuras 3 e 4; Tabelas 3 e 4).

Houve redução na infectividade dos JI ao longo do tempo para os dois nematóides nas temperaturas testadas em todos os tratamentos; porém, quando na temperatura de 28°C, o uso de algumas substâncias manteve maior o índice de infectividade do que quando comparado ao tratamento apenas com água. O mesmo não foi observado para as demais temperaturas (8 e 16°C), nas quais não foi observado efeito das substâncias testadas como agentes conservantes na infectividade (Figuras 3 e 4).

Para *S. carpocapsae* A11 ocorreu uma redução acentuada na infectividade a partir dos 60 dias de armazenamento na temperatura de 28°C, com o tratamento glicerina mantendo a infectividade maior do que para os demais tratamentos e a testemunha até o período de armazenamento de 150 dias

(Figura 3C). Esse resultado corresponde ao que foi obtido na curva de regressão do estudo de viabilidade (Figura 1C), mostrando que a glicerina manteve esses nematóides viáveis e infectantes por um período maior de tempo.

O mesmo resultado foi obtido para a temperatura de 16°C, apesar de essa diferença não ser tão acentuada como na temperatura de 28°C. Quando em 8°C, o uso de substâncias para prolongar a infectividade dos JI não foi eficaz, com curvas similares de regressão entre os tratamentos e a testemunha (Figura 3A). As curvas de sobrevivência e infectividade foram correspondentes para 16 e 28°C, mostrando que os JI mantidos vivos estavam também infectantes; já a 8°C, a sobrevivência manteve-se por um período longo (57,1% para a testemunha aos 180 dias), porém a manutenção da infectividade não foi notada (Figuras 1 e 3).

A 8°C houve diferença significativa entre os tratamentos; todavia, aos 180 dias nenhum tratamento sobressaiu-se à testemunha, mostrando que não houve melhoria na condição de armazenamento nessa temperatura (Tabela 1 e 3).

Quando em 16°C, houve diferença entre os tratamentos a partir de 120 dias, e aos 180 dias os tratamentos glicerina e etileno glicol diferiram dos demais, mantendo maior a infectividade dos JI. A partir dos 90 dias, na temperatura de 28°C, os tratamentos não apresentaram nematóides infectantes, exceto o tratamento glicerina, e aos 150 dias não foi encontrado nematóide

infectante em nenhum tratamento. Apesar de a porcentagem de infectividade ter sido baixa aos 28°C no tratamento com glicerina, essa diferiu dos demais, mostrando que a adição de glicerina prolongou o período de infectividade desses nematóides para essa temperatura, sendo esses dados correspondentes aos de sobrevivência (Tabela 1 e 3).

Para *Heterorhabditis* sp. JPM4 não foi observada infectividade na temperatura de 8°C para todos os tratamentos já na primeira avaliação, aos 30 dias, mostrando que mesmo havendo nematóides vivos até os 60 dias de armazenamento (Figura 2), estes não são mais infectantes (Tabela 4).

Quando em 16°C, houve uma redução gradativa da infectividade, exceto para o tratamento com glicose, com redução acentuada. Além disso, o tratamento com NaOCl prejudicou a infectividade desde a primeira avaliação aos 30 dias, não causando mortalidade em *G. mellonella*. Este resultado corresponde ao obtido na avaliação de sobrevivência, uma vez que NaOCl causou alta mortalidade desses nematóides desde o princípio do armazenamento em todas as temperaturas (Figura 2 e 4).

Em 28°C, os tratamentos reduziram acentuadamente a infectividade até os 90 dias para todos os tratamentos, o que também foi observado para sobrevivência; porém, o tratamento glicerina manteve a sobrevivência elevada até os 150 dias de avaliação, sem manutenção da infectividade (Figura 2C e 4B).

Quando em 8°C, nenhuma substância testada promoveu melhoria na condição de armazenamento, pois apesar de terem sido encontrados nematóides vivos, o teste de infectividade não foi positivo. Em 16°C, houve diferença entre os tratamentos a partir dos 90 dias; entretanto, nenhum tratamento sobressaiu-se à testemunha, e aos 150 dias o Triton[®], glicerina e etileno glicol, apesar de contribuírem para manter a infectividade, não diferiram da testemunha, não havendo efeito dessas substâncias como agentes conservantes para o parâmetro infectividade. Aos 28°C houve diferença entre os tratamentos desde a primeira avaliação, e aos 90 dias o tratamento com glicerina diferiu dos demais, mantendo maior a infectividade dos nematóides. O mesmo foi observado aos 120 dias; porém, aos 150 dias não houve mortalidade em nenhum tratamento testado, apesar de a sobrevivência ter sido mantida (Tabela 2 e 4). Apesar disso, observou-se que a sobrevivência e a infectividade de *Heterorhabditis* sp. JPM4 foram prolongadas quando usada glicerina na temperatura de 28°C.

Dessa forma, para o nematóide *Heterorhabditis* sp. JPM4, houve efeito da glicerina quando em 28°C para manutenção da sobrevivência e infectividade. A 16°C não houve efeito dos tratamentos testados, pois glicerina e etileno glicol não diferiram da testemunha quanto à infectividade. Na temperatura de 8°C também não ocorreu efeito das substâncias testadas, já que os nematóides morreram no princípio das avaliações e em nenhuma avaliação causaram mortalidade.

Para *S. carpocapsae* A11 não houve efeito das substâncias testadas na temperatura de 8°C, pois nenhum tratamento foi melhor que a testemunha. A 16°C, o tratamento com glicerina prolongou a sobrevivência e infectividade dos nematóides, diferindo da testemunha apenas na última avaliação, aos 180 dias, e com uma baixa porcentagem de infectividade (28%) (Tabela 3). A 28°C houve efeito do uso da glicerina, pois esta prolongou a infectividade dos nematóides por 60 dias; no entanto, aos 120 dias a infectividade foi baixa (16%) e aos 150 dias não havia nematóides vivos (Tabela 3).

Constatou-se que a glicerina agiu como uma substância conservante na temperatura de 28°C para os dois nematóides testados e também a 16°C para o nematóide *S. carpocapsae* A11. As demais substâncias usadas, mesmo quando mantiveram os nematóides vivos, não mostraram esse efeito em relação à infectividade, não exercendo uma ação conservante.

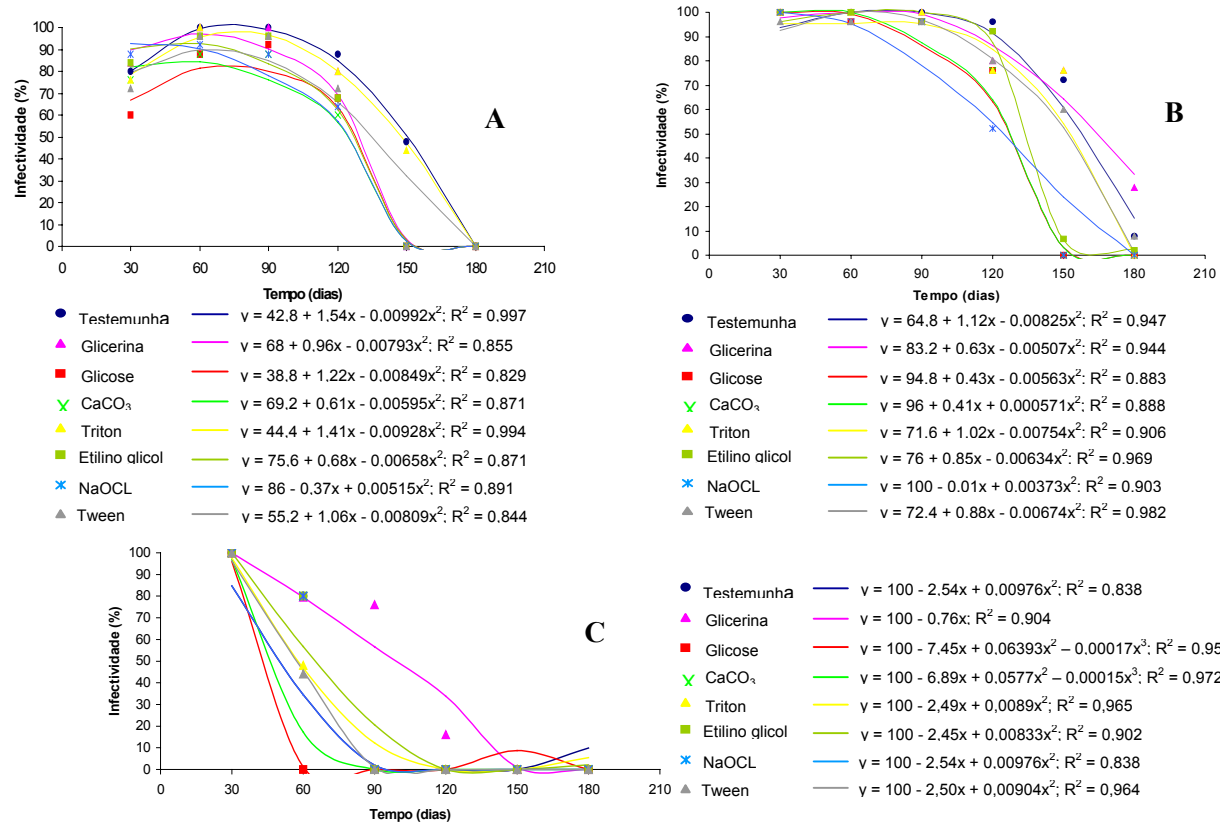


Figura 3. Efeito do tempo na infectividade (%) de juvenis infectantes de *Steinernema carpocapsae* A11 sobre lagartas de *Galleria mellonella* mantidos em suspensão aquosa com substâncias conservantes, em três temperaturas. A: 8°C, B: 16°C e C: 28°C.

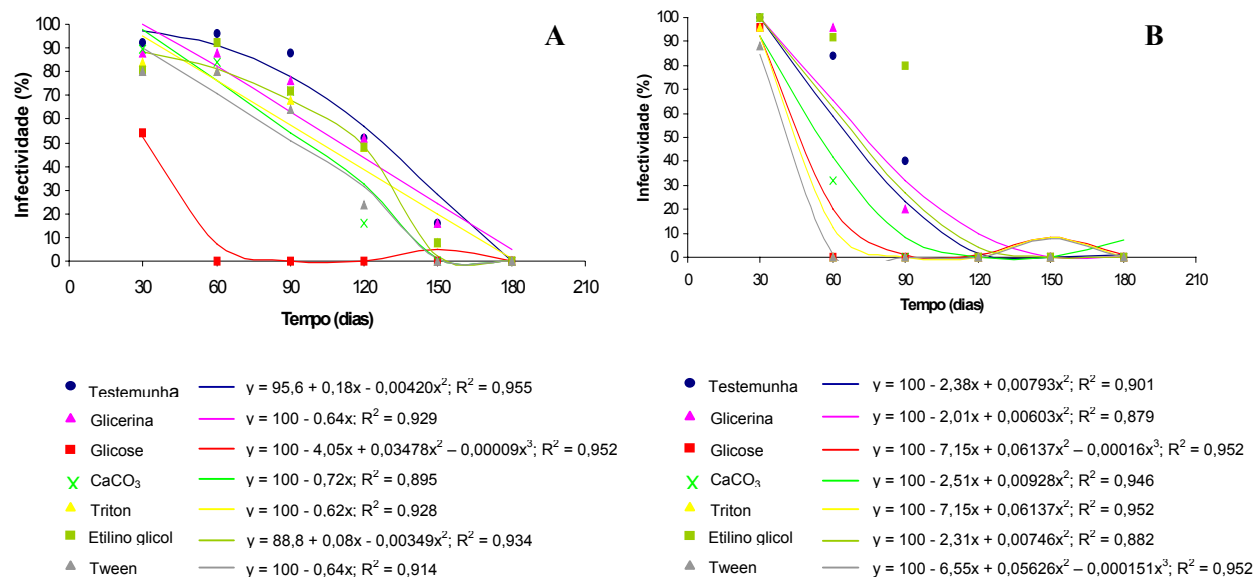


Figura 4. Efeito do tempo na infectividade (%) de juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. JPM4 sobre lagartas de *Galleria mellonella* mantidos em suspensão aquosa com substâncias conservantes, em três temperaturas. A: 8°C, B: 16°C e C: 28°C.

Tabela 3. Efeito de substâncias com potencial conservante na infectividade (%) de juvenis infectantes de *Steinernema carpocapsae* A11 sobre lagartas de *Galleria mellonella* mantidos em suspensão aquosa, em três temperaturas, ao longo do tempo.

Tempo (dias)	Temperatura (°C)	Testemunha*	Triton	Glicerina	CaCO ₃	NaOCl	Etileno glicol	Glicose	Tween
30	8	80,0 ± 6,3 a	76,0 ± 4,0 a	84,0 ± 4,0 a	76,0 ± 4,0 a	88,0 ± 4,9 a	84,0 ± 4,0 a	60,0 ± 6,3 b	72,0 ± 4,9 b
	16	100 ± 0,0 a	100 ± 0,0 a	100 ± 0,0 a	100 ± 0,0 a	100 ± 0,0 a	100 ± 0,0 a	100 ± 0,0 a	96,0 ± 4,0 a
	28	100 ± 0,0 a	100 ± 0,0 a	100 ± 0,0 a	100 ± 0,0 a	100 ± 0,0 a	100 ± 0,0 a	100 ± 0,0 a	100 ± 0,0 a
60	8	100 ± 0,0 a	100 ± 0,0 a	96,0 ± 0,0 a	88,0 ± 4,9 a	92,0 ± 4,9 a	100 ± 0,0 a	88,0 ± 4,9 a	96,0 ± 4,0 a
	16	100 ± 0,0 a	100 ± 0,0 a	100 ± 0,0 a	100 ± 0,0 a	96,0 ± 4,0 a	100 ± 0,0 a	96,0 ± 4,0 a	96,0 ± 4,0 a
	28	8,0 ± 4,9 c	48,0 ± 4,9 b	79,6 ± 3,3 a	8,0 ± 4,9 c	8,0 ± 4,9 c	80,0 ± 6,3 a	0,0 ± 0,0 d	44,0 ± 7,4 b
90	8	100 ± 0,0 a	96,0 ± 4,0 a	100 ± 0,0 a	88,0 ± 8,0 a	88,0 ± 8,0 a	96,0 ± 4,0 a	92,0 ± 4,9 a	96,0 ± 4,0 a
	16	100 ± 0,0 a	100 ± 0,0 a	100 ± 0,0 a	96,0 ± 4,0 a	96,0 ± 4,0 a	96,0 ± 4,0 a	96,0 ± 4,0 a	96,0 ± 4,0 a
	28	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	76,0 ± 7,4 a	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b
120	8	88,0 ± 8,0 a	80,0 ± 6,4 a	80,0 ± 6,4 a	60,0 ± 6,4 b	64,0 ± 7,5 b	68,0 ± 4,9 b	68,0 ± 4,9 b	72,0 ± 4,9 b
	16	96,0 ± 4,0 a	76,0 ± 7,4 b	80,0 ± 8,9 b	76,0 ± 4,0 b	52,0 ± 4,9 c	92,0 ± 4,9 a	76,0 ± 7,5 b	80,0 ± 4,9 b
	28	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	16,0 ± 7,5 a	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b
150	8	48,0 ± 8,0 a	44,0 ± 7,5 a	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b
	16	72,0 ± 4,9 a	76,0 ± 7,5 a	76,0 ± 7,5 a	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	68,0 ± 4,9 a	0,0 ± 0,0 b	60,0 ± 6,3 a
	28	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a
180	8	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a
	16	8,0 ± 4,9 b	0,0 ± 0,0 b	28,0 ± 4,9 a	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	20,0 ± 6,3 a	0,0 ± 0,0 b	8,0 ± 4,9 b
	28	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a

*Médias seguidas por letras distintas nas linhas dentro de cada tempo diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P < 0,05).

M ± EP (M)

Tabela 4. Efeito de substâncias com potencial conservante na infectividade (%) de juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. JPM4 sobre lagartas de *Galleria mellonella* mantidos em suspensão aquosa, em três temperaturas, ao longo do tempo.

Tempo (dias)	Temperatura (°C)	Testemunha*	Triton	Glicerina	CaCO ₃	NaOCl	Etileno glicol	Glicose	Tween
30	8	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a
	16	92,0 ± 4,9 a	84,0 ± 4,0 a	88,0 ± 8,0 a	89,6 ± 4,5 a	0,0 ± 0,0 c	80,8 ± 6,3 a	54,4 ± 7,4 b	80,0 ± 6,3 a
	28	100 ± 0,0 a	96,0 ± 4,0 a	96,0 ± 4,0 a	100 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 c	100 ± 0,0 a	96,0 ± 4,0 a	88,0 ± 4,9 b
60	8	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a
	16	96,0 ± 4,0 a	80,0 ± 6,3 a	88,0 ± 8,0 a	84,0 ± 7,4 a	0,0 ± 0,0 b	92,0 ± 4,9 a	0,0 ± 0,0 b	80,0 ± 6,3 a
	28	84,0 ± 7,4 b	0,0 ± 0,0 d	96,0 ± 4,0 a	32,0 ± 8,0 c	0,0 ± 0,0 d	92,0 ± 8,0 a	0,0 ± 0,0 d	0,0 ± 0,0 d
90	8	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a
	16	88,0 ± 4,9 a	68,0 ± 8,0 b	76,0 ± 7,4 b	72,0 ± 8,0 b	0,0 ± 0,0 c	72,0 ± 4,9 b	0,0 ± 0,0 c	64,0 ± 7,4 b
	28	4,0 ± 4,0 b	0,0 ± 0,0 b	20,0 ± 6,3 a	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	8,0 ± 4,9 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b
120	8	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a
	16	52,0 ± 4,9 a	48,0 ± 8,0 a	52,0 ± 8,0 a	16,0 ± 7,4 b	0,0 ± 0,0 c	48,0 ± 8,0 a	0,0 ± 0,0 c	24,0 ± 7,4 b
	28	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a
150	8	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a
	16	16,0 ± 7,4 a	8,0 ± 4,9 a	16,0 ± 9,8 a	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	8,0 ± 4,9 a	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b
	28	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a
180	8	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a
	16	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a
	28	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a

*Médias seguidas por letras distintas nas linhas dentro de cada tempo diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P < 0,05).

M ± EP (M)

A glicerina é usada como antidessecante a fim de retardar a evaporação da suspensão com nematóides aplicada na folhagem para controle de insetos-praga, reduzindo a dessecação (Broadbent & Olthof, 1995). O Triton X-100[®] é usado no armazenamento dos JI em água destilada, pois age evitando que os nematóides fiquem aderidos às laterais dos frascos (Woodring & Kaya, 1988).

Diversos são os fatores que influenciam a sobrevivência e infectividade dos nematóides entomopatogênicos. Além disso, existem diferenças entre as espécies. Membros da família Heterorhabditidae são mais sensíveis a radiação, produtos químicos, temperatura e dessecação do que os da família Steinernematidae, além de apresentarem pior estabilidade de armazenamento (Flanders et al., 1996). A longevidade desses nematóides a baixas temperaturas pode ser mais dependente da sua tolerância ao frio do que da quantidade de reservas energéticas (Grewal, 2000).

O mesmo foi observado no presente trabalho, já que *S. carpocapsae* teve uma redução gradual da sobrevivência e infectividade, enquanto para *Heterorhabditis* sp. JPM4 essa diminuição ocorreu rapidamente, principalmente nas temperaturas extremas de 8 e 28°C.

De acordo com Glazer (2002), a temperatura extrema é um dos fatores que limitam a sobrevivência desses organismos, influenciando tanto na sobrevivência como na mobilidade e infectividade. Em temperaturas de 8 e 12°C ocorreu redução de viabilidade e infectividade para os nematóides

Heterorhabditis sp. CCA e *Heterorhabditis* sp. JPM4 (Andaló et al., 2005). Além disso, juvenis infectantes de heterorhabditídeos são afetados em baixa temperatura, diminuindo a proporção de nematóides infectantes e a habilidade para procurar hospedeiros (Westerman, 1999). Dessa forma, esses resultados foram semelhantes aos encontrados nesse trabalho, uma vez que apesar de terem sido encontrados JI vivos, muitos já haviam perdido a capacidade de infectar o inseto.

Outro fator que influencia a atividade do nematóide é a mudança na composição química ou microbiana no meio em que ele se encontra (Dempsey & Griffin, 2002; Fitters & Griffin, 2004). O uso de substâncias adicionadas na água da suspensão poderá ser prejudicial ou favorecer a sobrevivência dos JI. Nesse trabalho, concluiu-se que a glicerina favoreceu o armazenamento dos JI na temperatura de 28°C, mostrando que a 8°C a morte dos nematóides possivelmente poderá estar mais associada à adaptação térmica. Com isso, a glicerina possivelmente agiu dando proteção à cutícula do nematóide.

Quando armazenados em água, os NEP economizam suas reservas de várias formas, mudando seu comportamento locomotor, entrando em quiescência, adotando postura estacionária ou por meio de processo de agregação. Isso possibilita a diminuição do gasto energético e a população supera as condições de estresse (Patel et al., 1997; Wright et al., 1997; Wright & Perry, 2002).

As fontes de energia dos nematóides são o glicogênio e lipídios, reservas por meio das quais eles irão manter-se vivos até encontrarem um novo hospedeiro para parasitar. A alta taxa de lipídios em JI permite maior sobrevivência; assim, os nematóides são dependentes de lipídios para um período maior de armazenamento, uma vez que a sobrevivência declina juntamente com a diminuição das reservas dos JI (Hass et al., 2002; Lewis et al., 1995; Menti et al., 2003). O uso da glicerina como conservante teve efeito principalmente em temperatura de 28°C, quando os nematóides se movimentam bastante e gastam suas reservas energéticas mais rapidamente. O mesmo não foi observado em temperatura de 8°C, quando os nematóides permanecem praticamente imóveis.

A baixa disponibilidade de oxigênio pode reduzir a sobrevivência dos nematóides (Glazer, 2002), e sua complementação para aumentar sobrevivência dos nematóides em suspensão aquosa durante o armazenamento poderá ser empregada (Andaló et al., 2006). Assim, além dessa condição para aumentar a sobrevivência desses nematóides, pode-se usar a temperatura e a adição de substância conservante.

O uso da glicerina pode potencializar a sobrevivência de JI desses NEP em condições de armazenamento a 28°C; porém, de acordo com Andaló et al. (2005), as porcentagens de sobrevivência e infectividade que foram obtidas a 16°C por até 180 dias foram maiores do que as encontradas nesse estudo na

temperatura de 28°C com glicerina. Com isso, o uso da glicerina como agente conservante é útil em casos em que o nematóide ficará em temperaturas altas, ou caso não exista controle da temperatura.

A sensibilidade de algumas espécies à variação de temperatura, a suscetibilidade a contaminantes microbianos e a toxicidade de agentes antimicrobianos são fatores que influenciam na qualidade do armazenamento em água (Grewal, 2000). Com isso, apesar de a dificuldade de armazenamento ser um dos maiores entraves para a expansão do uso de nematóides entomopatogênicos como bioinseticidas, estudos que avaliam os fatores que afetam a sobrevivência desses organismos têm permitido que o armazenamento seja realizado de forma mais adequada. Assim, o uso de uma substância que prolongue a sobrevivência e a mantenha a infectividade, para uma posterior liberação no campo em programas de controle de insetos, é desejável.

Literatura Citada

ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 1-34.

ANDALÓ, V.; MOINO JR., A.; MOLINA ACEVEDO, J. P.; CAVALCANTI, R. S.; CARVALHO, F. A. Efeito da temperatura e concentração na sobrevivência de nematóides entomopatogênicos em condições de armazenamento, visando seu uso no controle microbiano de pragas. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, Madrid, v. 31, n. 2, p. 253-265, abr./jun. 2005.

ANDALÓ, V.; CAVALCANTI, R. S.; MOLINA ACEVEDO, J. P.; MOINO JR., A.; MAGALHÃES, F. H. L. Influência da aeração no armazenamento de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida) em condições de laboratório. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 45-50, abr. 2006.

BROADBENT, A. B.; OLTHOF, T. H. A. Foliar application of *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) to control *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) larvae in chrysanthemums. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 24, n. 2, p. 431-435, Apr. 1995.

BROWN, I. M.; GAUGLER, R. Temperature and humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematodes. **Nematologica**, Leiden, v. 43, n. 5, p. 363-375, Sept. 1997.

DEMPSEY, C. M.; GRIFFIN, C.T. Phased activity in *Heterorhabditis megidis* infective juveniles. **Parasitology**, New York, v. 124, n. 6, p. 605-613, June 2002.

DUTKY, S. R.; THOMPSON, J. V.; CANTWE, G. E. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. **Journal of Insect Pathology**, San Diego, v. 6, n. 4, p. 417-422, 1964.

FERRAZ, L. C. C. B. Nematóides entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.541-569.

FITTERS, P. F. L.; GRIFFIN, C. T. Spontaneous and induced activity of *Heterorhabditis megidis* infective juveniles during storage. **Nematology**, Leiden, v. 6, n. 6, p. 911-917, Nov. 2004.

FLANDERS, K. L.; MILLER, J. M.; SHIELDS, E. J. *In vivo* production of *Heterorhabditis bacteriophora* 'Oswego' (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 89, n. 2, p. 373-380, Apr. 1996.

GAUGLER, R.; BROWN, I.; SHAPIRO-ILAN, D.; ATWA, A. Automated technology for in vivo mass production of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, San Diego, v. 24, n. 2, p. 199-206, June 2002.

GLAZER, I. Survival biology. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 169-188.

GREWAL, P. S. Anhydrobiotic potencial and long-term storage of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 14, p. 995-1000, Dec. 2000.

HASS, B.; DOWNES, M. J.; GRIFFIN, C. T. Persistence of four *Heterorhabditis* spp. isolates in soil: role of lipid reserves. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 34, n. 2, p. 151-158, June 2002.

HATAB, M. A.; GAUGLER, R. Lipids of in vitro cultured *Heterorhabditis bacteriophora*. **Biological Control**, San Diego, v. 15, n. 3, p. 113-118, July 1999.

KAYA, H. K.; STOCK, P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L. **Manual of techniques in insect pathology**. New York: Academic Press, 1997. p. 281-324.

LEWIS, E. E.; SELVAN, S.; CAMPBELL, J.F.; GAUGLER, R. Changes in foraging behaviour during the infective stages of entomopathogenic nematodes. **Parasitology**, New York, v. 110, n. 5, p. 583-590, June 1995.

LEWIS, E. E.; SHAPIRO-ILAN, D. Host cadavers protect entomopathogenic nematodes during freezing. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 81, n. 1, p. 25-32, Oct. 2002.

MENTI, H.; PATEL, M. N.; WRIGHT, D. J.; PERRY, R. N. Lipid utilisation during storage of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis megidis* from Greece and the UK. **Nematology**, Leiden, v. 5, n. 1, p. 31-37, 2003.

MOLINA J. P.; LÓPEZ, N. J. C. Producción in vivo de tres entomonematodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. **Revista Colombiana de Entomología**, Bogotá, v. 27, n. 1-2, p. 73-78, 2001.

PARRA, J. R. P. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 1015-1037.

PATEL, M. N.; STOLINSKI, M.; WRIGHT, D. J. Neutral lipids and the assessment of infectivity in entomopathogenic nematodes: observations on four *Steinernema* species. **Parasitology**, New York, v. 114, n. 6, p. 489-496, June 1997.

WESTERMAN, P. R. Aggregation of entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp., among host insects at 9 and 20°C and effects on efficacy. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 73, n. 2, p. 206-213, Mar. 1999.

WHITE, G. F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, Washington, v. 66, p. 302-303, 1927.

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. **Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: a handbook of biology and techniques**. Arkansas: Nematode Subcommittee of the Southern Regional, 1988. 30 p.

WRIGHT, D. J.; GREWAL, P. S.; STOLINSKI, M. Relative importance of neutral lipids and glycogen as energy stores in dauer larvae of two entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema feltiae*. **Comparative Biochemistry Physiology**, Oxford, v. 118, n. 2, p. 269-273, Oct. 1997.

WRIGHT, D. J.; PERRY, R. N. Physiology and biochemistry. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 145-168.

ARTIGO 6

Utilização de diferentes substratos para armazenamento
de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae,
Heterorhabditidae) (Preparado de acordo com as normas da revista
“Neotropical Entomology”)

VANESSA ANDALÓ¹

RICARDO S. CAVALCANTI¹

JUAN PABLO MOLINA AZEVEDO²

ALCIDES MOINO JR¹

¹Departamento de Entomologia - UFLA, C.P. 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG.

²CCTA/LPP (UENF), Av. Alberto Lamego 2000, CEP 28015-620, Campos dos Goytacazes, RJ.

Use of different substrata to storage entomopathogenic nematodes (Rhabditida:
Steinernematidae, Heterorhabditidae)

ABSTRACT – Having a goal to evaluate different substrata to extend the survival of entomopathogenic nematodes, suspensions of *Heterorhabditis* sp. JPM4 and *Steinernema carpocapsae* A11 (3,000 IJ/mL) were added to ground, fine sand, thick sand, foam, expanded clay, phenolic sponge, agar, maize starch, Plantmax[®] and water. They were placed in Petri dishes (5 cm) and kept in 16 ± 1°C. The evaluations of survival were made after 30, 60, 90, 120, 150 and 180 days, with three repetitions. After 180 days, for *S. carpocapsae* A11, foam (57.5%) kept a greater percentage of infective juveniles (IJ) alive than the others, while expanded clay (28.4%), Plantmax[®] (9.3%) and phenolic sponge (11%) were not efficient to keep the survival. Foam (55.6%), thick sand (53.1%) and fine sand (50.6%) provided greater survival of IJ at 180 days for *Heterorhabditis* sp. JPM4. Ágar (19.3%), phenolic sponge (11.6%) and Plantmax[®] (10.7%) had inferior indices of survival than the control (29.7%). The use of an appropriate substratum can provide a greater survival of IJ.

Keywords: *Heterorhabditis*, *Steinernema*, biological control, persistence, survival.

RESUMO - Com objetivo de avaliar substratos para prolongar a sobrevivência dos nematóides entomopatogênicos (NEP), suspensões de *Heterorhabditis* sp. JPM4 e *Steinernema carpocapsae* A11 (3.000 JI/mL) foram adicionadas aos substratos solo, areia fina, areia grossa, espuma, argila expandida, esponja fenólica, ágar, amido de milho, Plantmax[®] e água. Estes foram colocados em placas de Petri (5 cm) e mantidos a $16 \pm 1^\circ\text{C}$. As avaliações foram feitas após 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, com três repetições para cada dia. Após 180 dias, para *S. carpocapsae* A11 o substrato espuma (57,5%) manteve maior porcentagem de juvenis infectantes (JI) vivos; argila expandida (28,4%), Plantmax[®] (9,3%) e esponja fenólica (11%) não foram eficientes para manutenção da sobrevivência. Para *Heterorhabditis* sp. JPM4, espuma (55,6%), areia grossa (53,1%) e areia fina (50,6%) proporcionaram maior sobrevivência dos JI ao final de 180 dias. Ágar (19,3%), esponja fenólica (11,6%) e Plantmax[®] (10,7%) tiveram índices de sobrevivência inferiores ao da testemunha (29,7%). O uso de substrato adequado pode propiciar maior sobrevivência de JI.

Palavras-chave: *Heterorhabditis*, *Steinernema*, controle biológico, persistência, sobrevivência.

Os nematóides entomopatogênicos (NEP) estão sendo cada vez mais estudados para o controle de pragas. São compatíveis com muitos produtos fitossanitários, possibilitando o uso em programas de manejo integrado, além de apresentarem sinergismo com outros agentes entomopatogênicos, aumentando a eficiência e a economia do método utilizado. A associação mutualística com bactérias resulta em morte rápida dos insetos parasitados (Ferraz, 1998).

Os NEPs podem ser armazenados em diversos substratos além de suspensão aquosa, como carvão ativado, alginato, vermiculita e argila. Além disso, podem ser multiplicados *in vitro* utilizando como substrato uma espuma porosa, que fornece alta razão superfície-volume, além de um adequado espaço intersticial (Kaya & Stock, 1997). O armazenamento em espuma é feito aplicando cerca de 500-1000 JI/cm² de área, e para remoção dos JI deve-se adicionar água à espuma e espremer manualmente (Grewal, 2000)

Diversas formas são usadas para melhorar a formulação desses nematóides que auxiliam no armazenamento dos NEP por períodos maiores de tempo. Nas formulações em grânulos dispersíveis em água, os nematóides são revestidos com uma mistura de substâncias absorventes,

argila, sílica, celulose, lignina e amido. Esta formulação oferece grande estabilidade para o armazenamento devido à indução parcial de anidrobiose, que reduz o metabolismo de JI (Grewal, 2000).

Fatores como radiação solar e luz ultravioleta também influenciam a sobrevivência de nematóides, podendo ser considerados deletérios. Além disso, JI são atraídos por pH básico e repelidos por pH ácido. Em relação à movimentação, o uso de argila e de silte resulta em redução no deslocamento dos nematóides quando comparados com areia (Woodring & Kaya, 1988).

NEP preferem solos arenosos, os quais possibilitam melhor movimentação e oxigenação, a solos argilosos (Burman & Pye, 1980; Kung et al., 1990). Outro fator que influencia a atividade do nematóide é a mudança na composição química ou microbiana no meio em que ele está (Dempsey & Griffin, 2002; Fitters & Griffin, 2004).

Nematóides da família Heterorhabditidae são mais sensíveis a radiação, produtos químicos, temperatura e dessecação do que os da família Steinernematidae, além de apresentarem pior estabilidade de armazenamento (Flanders et al., 1996). Desta forma, os substratos em que os nematóides são armazenados influenciam na sua sobrevivência, pois

podem alterar o padrão de movimentação, ter variação de pH, ou mesmo influenciar na quantidade de luz que incide sobre os nematóides, podendo alterar a temperatura.

As estratégias usadas pelos NEPs para sobreviver em condições adversas (dessecação, congelamento, radiação ultravioleta, doenças e predação) são pouco conhecidas. De acordo com Molina & López (2003), uma baixa umidade favorece processos de anidrobiose, o que incide negativamente na infectividade dos nematóides. Assim, o estudo dos parâmetros que influenciam a sobrevivência dos NEP é um aspecto importante para sua liberação no campo em programas de controle biológico (Brown & Gaugler, 1997).

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o uso de diferentes substratos para duas espécies de nematóides entomopatogênicos durante o período de armazenamento.

Material e Métodos

Multiplicação e manutenção dos nematóides entomopatogênicos

Os nematóides *Steinernema carpocapsae* A11 (Weiser, 1955) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding 1982 e *Heterorhabditis* sp. JPM4

foram cultivados no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil. Esses foram mantidos em frascos Erlenmeyer em câmara climática do tipo BOD, com temperatura de $16 \pm 1^\circ\text{C}$, em suspensão aquosa com 500 a 1.000 JI/mL.

A multiplicação dos nematóides foi feita com lagartas de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae), criadas no Laboratório de Patologia de Insetos de acordo com metodologia descrita por Dutky et al. (1964), utilizando dieta artificial modificada por Parra (1998).

Dez lagartas de último ínstar de *G. mellonella* foram transferidas para placas de Petri com 9 cm de diâmetro, contendo papel filtro no seu interior, para multiplicação das duas espécies de NEP utilizadas neste estudo. Simultaneamente, foi adicionado 1mL de suspensão dos nematóides na concentração de 20 JI/lagarta. As placas foram mantidas em câmara BOD por 72h, em temperatura de $24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ e escotofase de 24h. Após confirmação da sintomatologia característica da morte das lagartas, estas foram transferidas para câmara seca (Molina & López, 2001) por 4 dias.

Após este período, as lagartas foram transferidas para armadilha modificada de White (White, 1927) para serem coletados os JI dos nematóides. As armadilhas foram mantidas em BOD por um período de 3 a 7 dias. A suspensão de nematóides recolhida diariamente foi transferida para provetas com capacidade de 1.000 mL, contendo 800 mL de água destilada, para que os JI decantassem em 24 h. Este processo de decantação teve a finalidade de separar corpos gordurosos do inseto dos JI. Na proveta foi também adicionado o espalhante adesivo Tween 80® a 0,1%. Depois de realizado o processo de purificação dos nematóides, foram feitas a diluição e a quantificação da suspensão de nematóides em placas plásticas para testes serológicos (“Elisa”) em microscópio estereoscópico.

Avaliação de diferentes substratos no armazenamento de juvenis infectantes de nematóides entomopatogênicos

Foi avaliada a sobrevivência de *S. carpocapsae* A11 e *Heterorhabditis* sp. JPM4, mantidos em BOD (temperatura $16 \pm 1^\circ\text{C}$ e 24 h de escotofase) ao longo do tempo de armazenamento.

Foram utilizados nematóides recém-emergidos (3.000 JI/mL) adicionados aos substratos solo (latossolo vermelho de textura argilosa), areia fina (granulometria de 0,05 mm), areia grossa (granulometria de 0,5 mm), espuma, argila expandida (a argila é submetida a altas temperaturas, gerando um espaço interno com microporos e casca rígida e resistente), esponja fenólica (substrato usado para arranjos de plantas ornamentais a fim de reter água), ágar, amido de milho e substrato Plantmax[®] (à base de Vermiculita[®] e casca de *Pinus* sp.).

Os tratamentos foram colocados em placas de Petri de 5 cm, com três repetições para cada dia da avaliação, sendo cada repetição representada por uma placa de Petri. Foi adicionada água destilada esterilizada, mantendo-se os substratos com saturação de 11% (peso/volume).

Nos tratamentos com espuma e esponja fenólica, estes substratos foram cortados com 4,5 cm de diâmetro e 1,0 cm de altura. O ágar foi preparado na concentração de 2% e, antes de endurecer completamente, foi adicionada a suspensão com o nematóide. A testemunha constou apenas da suspensão dos nematóides na placa de Petri, sem a adição de qualquer substrato.

Para a montagem do tratamento constituído por areia fina, esta foi primeiramente passada em peneira de 24 mesh (0,71 mm). No tratamento com areia grossa, a peneira utilizada foi de 16 mesh (1 mm), e no tratamento em que foi usado solo, a peneira de 5 mesh (4 mm) foi utilizada a fim de retirar material não desejado, como pedaços de galhos, folhas ou pedras. As avaliações foram realizadas aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, por meio da contagem dos juvenis infectantes vivos. A obtenção da suspensão dos nematóides recuperada dos substratos foi feita de diferentes formas, de acordo com cada tratamento.

Para obtenção da suspensão dos JI mantidos em areia fina e em areia grossa, foi utilizada uma peneira de 150 mesh por cima de uma peneira de 500 mesh, ficando os nematóides retidos na peneira inferior e, então, coletados para cálculo da sobrevivência. O procedimento para o tratamento com solo, Plantmax[®] e amido de milho foi o mesmo descrito anteriormente, porém a peneira usada por cima foi a de 325 mesh. No caso da argila expandida, esta foi lavada com água em peneira de 16 mesh e os nematóides foram coletados na suspensão aquosa resultante.

No substrato esponja fenólica foi usada peneira de 325 mesh, colocando-a dentro da peneira e espremendo manualmente, adicionando

água para auxiliar. Assim, pedaços do substrato ficaram retidos na peneira e os nematóides passaram e foram coletados. Para o tratamento com espuma, esta foi espremida manualmente junto com adição de água e a suspensão com os nematóides foi coletada.

As placas com ágar foram divididas em três partes, considerando cada parte como um campo de contagem. Para a testemunha não foi necessário nenhum processo para a obtenção da suspensão, pois a esta não foi adicionado nenhum substrato.

As suspensões finais obtidas para cada tratamento foram diferentes; com isso, para todos os tratamentos foram contados randomicamente cem nematóides por cada contagem, sendo feitas três contagens para cada repetição. Foi contado o número de nematóides vivos e mortos em uma alíquota de 0,1 mL, a fim de obter a porcentagem de sobrevivência, utilizando placas plásticas para teste serológico (exceto para o tratamento com ágar, no qual não se obteve suspensão), empregando-se microscópio estereoscópico. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao Teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) para comparação entre as médias para os substratos e à análise de regressão para avaliação do efeito do tempo de armazenamento.

Resultados e Discussão

Foram constatadas diferenças na sobrevivência dos JI armazenados nos substratos testados ao final de 180 dias de armazenamento em relação àquelas mantidas somente em água. Essas diferenças ocorreram tanto para *S. carpocapsae* A11 como para *Heterorhabditis* sp. JPM4; porém, cada espécie se comportou de forma diferente em relação ao substrato utilizado (Tabelas 1 e 2).

S. carpocapsae A11, quando se utilizou espuma como substrato, manteve uma maior porcentagem de nematóides vivos do que os demais; no entanto, outros substratos também proporcionaram resultados superiores à testemunha (JI em água), sendo eles areia fina, areia grossa, ágar, amido e solo.

Os substratos argila expandida, Plantmax[®] e esponja fenólica foram piores para a manutenção da sobrevivência do que a testemunha. A porcentagem de sobrevivência para o armazenamento em espuma foi de 57,5% aos 180 dias, enquanto, para a testemunha, foi de 35,3%, evidenciando o uso desse material para manutenção de JI em longo período em laboratório. Para curtos períodos (até 90 dias) de armazenamento, o tratamento testemunha manteve a sobrevivência dos JI

da mesma forma como os demais substratos que aos 180 dias foram superiores. Apenas a partir de 120 dias outros substratos (areia fina, areia grossa, amido e espuma) diferiram da testemunha, com índices de sobrevivência dos JI maiores (Tabela 1).

O mesmo padrão de resultados foi observado na espécie *Heterorhabditis* sp. JPM4, que também apresentou diferença entre os tratamentos testados (Tabela 2). Os substratos areia fina, areia grossa e espuma foram os que mantiveram os maiores índices de sobrevivência dos JI ao final de 180 dias de armazenamento. Os substratos amido e solo apresentaram porcentual de sobrevivência maior do que a testemunha, podendo, assim, também ser considerados para o armazenamento de *Heterorhabditis* sp. JPM4. O substrato argila expandida não diferiu da testemunha e os demais substratos (água, esponja fenólica e Plantmax[®]) tiveram índices de sobrevivência inferiores ao da testemunha. A maior porcentagem de sobrevivência foi observada nos tratamentos com espuma, areia grossa e areia fina. Para a testemunha, este valor foi de 29,7%; portanto, menor que os obtidos quando utilizados substratos diferentes de apenas água.

Para *Heterorhabditis* sp. JPM4 obteve-se maior porcentagem de sobrevivência em relação à testemunha a partir de 90 dias de armazenamento, quando areia fina, areia grossa, amido e espuma diferiram da testemunha (Tabela 2). Quando são comparados os substratos em que os melhores resultados para manutenção da sobrevivência foram obtidos para os dois nematóides testados (espuma, areia fina, areia grossa e amido), tem-se que a sobrevivência de *Heterorhabditis* sp. JPM4 pode ser equiparada à de *S. carpocapsae* A11, enquanto, na testemunha, *S. carpocapsae* A11 teve sobrevivência maior do que *Heterorhabditis* sp. JPM4, mostrando que a sobrevivência desse nematóide ao longo do tempo pode ser menor em condições de armazenamento.

Quando usado como substrato o ágar, obteve-se grande diferença entre os dois nematóides, pois para *S. carpocapsae* A11 esse substrato foi melhor que a testemunha, enquanto, para *Heterorhabditis* sp. JPM4, ficou entre os piores substratos para armazená-los (Tabelas 1 e 2). Assim, este resultado mostra que existem diferenças no comportamento e nas necessidades de cada nematóide para seu armazenamento.

Houve redução na sobrevivência dos nematóides *S. carpocapsae* A11 e *Heterorhabditis* sp. JPM4 ao longo do tempo (30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias) para todos os tratamentos testados, sendo observadas curvas de regressão semelhantes para os dois nematóides. Os resultados de sobrevivência do tratamento com ágar foram os que geraram maiores diferenças entre as curvas dos dois nematóides (Figs. 1 e 2).

Ocorreu redução gradativa na sobrevivência dos JI ao longo do tempo para a maioria dos tratamentos; no entanto, para os substratos Plantmax[®] e esponja fenólica, esse decréscimo na sobrevivência ocorreu rapidamente. No caso de *Heterorhabditis* sp. JPM4, esse fato também ocorreu quando foi usado ágar. Ao final da avaliação, aos 180 dias, houve diferença acentuada na porcentagem de nematóides vivos em relação ao início da avaliação, aos 30 dias, para a testemunha e os demais tratamentos com valores obtidos inferiores ao dela, sendo encontrados poucos nematóides vivos na última avaliação. Já para os demais substratos, observou-se diminuição na sobrevivência dos JI, porém mais lenta, mostrando o efeito do uso do substrato ao longo do tempo (Figs. 1 e 2).

Os resultados obtidos mostram a importância do uso de diferentes substratos para potencializar a sobrevivência de JI de NEP não só em condições como as de cultivo e multiplicação *in vitro*, mas também em condições de armazenamento. Além disso, o ideal para uma espécie nem sempre é o mesmo para outra, já que estas apresentam características intrínsecas bastante diferentes.

De acordo com Tanada & Kaya (1993), JI de *Steinernema* spp. podem permanecer vivos por até 5 anos em condições de laboratório. Todavia, essa sobrevivência é relativa, pois devem ser levados em consideração a espécie em questão, as condições de armazenamento e outros fatores, como a temperatura, o substrato, a reserva energética e o oxigênio.

A espécie *Steinernema carpocapsae* perde água mais lentamente e tem maior sobrevivência sobre condições controladas que *S. feltiae* e *S. riobrave*, já que o comportamento “ambusher” desses dois nematóides os expõe a uma mais rápida dessecação no ambiente, pois no processo de “nictating” eles colocam mais de 90% do seu corpo no ar em busca de hospedeiros (Grewal et al., 1994; Patel et al., 1997). No presente trabalho observou-se que *S. carpocapsae*, quando em solução aquosa sem adição

de substrato, manteve sua sobrevivência maior que *Heterorhabditis* sp. JPM4 até o fim das avaliações, mostrando característica inerente da espécie de sobreviver por mais tempo armazenada em água do que os nematóides do gênero *Heterorhabditis*.

Quando em suspensão aquosa, os nematóides decantam e formam um precipitado no fundo do recipiente. Assim, um aglomerado se forma, deixando os nematóides em uma situação de estresse com ambiente de baixo teor de oxigênio, que pode acelerar a perda de reservas energéticas, como os lipídios (Gaugler et al., 2002). Uma técnica usada para diminuir esses agregados é o uso de solução de bicarbonato de sódio (NaH_2CO_3), que auxilia na quebra das rosetas que se formam, principalmente em heterorhabditídeos, sem causar outro efeito nos nematóides (Woodring & Kaya, 1988). O fato de maior agregação de heterorhabditídeos do que de steinernematídeos, diminuindo a oxigenação e levando à perda de reservas energéticas, pode ser outro fator que mantém os nematóides do gênero *Heterorhabditis* vivos por menos tempo.

O comportamento de agregação foi observado no presente trabalho apenas para o tratamento testemunha; com isso, assim como o uso do NaH_2CO_3 diminui a agregação entre eles, o uso de outros

substratos, como areia, solo e espuma, pode os manter mais distantes um do outro, dificultando o processo de agregação.

Quando armazenados em água, os NEP utilizam suas reservas de forma diferente, mudando seu comportamento locomotor, entrando em quiescência e adotando postura estacionária, maneiras de diminuir o gasto energético e superar condições de estresse (Patel et al., 1997; Wright et al., 1997; Wright & Perry, 2002). O uso de substratos para armazenamento pode reduzir o estresse, criando um ambiente mais próximo ao natural do que o armazenamento feito apenas em água, pois pode fornecer maior oxigenação e melhor condição para movimentação dos JI, sem que eles precisem entrar em dormência.

O glicogênio e os lipídios são usados como fonte de energia dos nematóides, reservas por meio das quais manter-se vivos até encontrarem um novo hospedeiro para parasitar. A alta taxa de lipídios em JI permite maior sobrevivência; assim, os nematóides são dependentes de lipídios para um longo armazenamento, pois a sobrevivência declina juntamente com a diminuição das reservas dos JI (Hass et al., 2002; Lewis et al., 1995; Menti et al., 2003). Assim, utilizando substratos com areia, espuma e ágar para *S. carpocapsae* A11, foi possível a manutenção dos

nematóides vivos por maior tempo do que em suspensão aquosa (testemunha), o que pode ter auxiliado na diminuição do gasto de suas reservas lipídicas.

Em relação à oxigenação, nematóides em altas concentrações, tais como 100.000 JI/mL, são prejudicados quando em suspensões sem fornecimento de oxigênio. Nessa condição, o ideal é usar concentração de 10.000 até 20.000 JI/mL (variável de acordo com a espécie) e uma coluna de água de não mais que 1 cm (Andaló et al., 2005; Woodring & Kaya, 1988). Quando avaliadas as suspensões de JIs armazenados nos substratos ágar, areia fina, areia grossa e espuma, observou-se que esses ficaram menos agregados do que aqueles armazenados apenas em água, estando espalhados pelo substrato ao invés de se concentrarem no fundo do recipiente. Isso poderá favorecer uma diminuição na demanda de oxigênio.

Lewis & Shapiro-Ilan (2002) usaram areia para armazenamento de JI de *S. carpocapsae*, *S. glaseri*, *S. feltiae* e *H. bacteriophora* a -8°C , comparando com o congelamento dos nematóides nos próprios cadáveres de *G. mellonella*, e observaram que este foi mais adequado do que a areia. Conforme o substrato utilizado para armazenamento, os JI têm maior ou

menor facilidade para se movimentar, obter oxigênio e agregar, podendo aumentar ou diminuir o gasto energético. Com isso, observou-se que os substratos como solo e amido, nos quais o espaço entre as partículas é menor, não foram adequados para prolongar a sobrevivência dos JI. O solo utilizado (latossolo vermelho-amarelo), com alto teor de argila, dificulta a movimentação dos nematóides e diminui a difusão de oxigênio. O mesmo foi descrito por Kung et al. (1990) em relação à melhor adaptação dos nematóides a solos arenosos do que argilosos.

Os JI apresentam cutícula dupla, sendo que a cutícula externa é proveniente do segundo estágio juvenil. A cutícula protege os JI de fatores adversos, mas, mesmo assim, eles sofrem a ação do ambiente. Quando no solo ou em armazenamento a cutícula os protege, propiciando maior longevidade. Os JI apresentam boca e ânus fechados para evitar a penetração de antagonistas e produtos químicos tóxicos, o que impossibilita a alimentação dos nematóides nesse estágio. Dessa forma, estes devem conter reservas energéticas suficientes até que encontrem o hospedeiro (Glazer, 2002; Welch, 1963). Como os JI permanecem no solo até encontrarem um hospedeiro, o substrato em que se encontram auxilia na sua proteção contra fatores adversos. De acordo com os resultados

obtidos, conclui-se que cada substrato agiu de forma diferente no armazenamento dos nematóides.

Assim, fatores como o espaço intersticial do substrato, que influencia na quantidade de oxigênio e na movimentação do nematóide, e a quantidade de umidade mantida no substrato têm grande influência na sobrevivência dos nematóides.

Para armazenamento por período superior a um ano, os JI podem ser adicionados à espuma de poliuretano umedecida autoclavada e, então, colocados em um recipiente esterilizado e com fornecimento de oxigênio, utilizando filtros bacterianos (Bedding, 1984; Ley & Mundo-Campo, 2004). O resultado encontrado no presente trabalho corrobora o descrito anteriormente, pois mesmo com 180 dias de armazenamento em espuma, mais de 50% dos JI permaneceram vivos, tanto para *Heterorhabditis* sp. JPM4 como para *S. carpocapsae* A11.

Com base nesses resultados, pode-se considerar a espuma um substrato adequado para manutenção dos dois nematóides testados; para *Heterorhabditis* sp. JPM4, além da espuma, os substratos areia fina e areia grossa também foram considerados adequados para seu armazenamento.

A dificuldade de armazenamento é um dos maiores entraves para a expansão do uso de NEP como bioinseticida. A alta demanda de oxigênio, a sensibilidade de algumas espécies à variação de temperatura, a suscetibilidade a contaminantes microbianos e a toxicidade de agentes antimicrobianos são fatores que influenciam na qualidade do armazenamento em água (Grewal, 2002).

Com isso, tem-se que o uso de um substrato adequado auxilia na sobrevivência dos nematóides por um período de tempo maior, sendo que o estudo dos parâmetros que influenciam a sobrevivência dos NEP é um aspecto importante para sua posterior liberação no campo em programas de controle de insetos.

Referências Bibliográficas

ANDALÓ, V.; MOINO JR., A.; MOLINA ACEVEDO, J. P.; CAVALCANTI, R. S.; CARVALHO, F. A. Efeito da temperatura e concentração na sobrevivência de nematóides entomopatogênicos em condições de armazenamento, visando seu uso no controle microbiano de pragas. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, Madrid, v. 31, n. 2, p. 253-265, abr.jun. 2005.

BEDDING, R. A. Large-scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes *Neoplectana* spp. and *Heterorhabditis*. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v. 101, n. 1, p. 117-120, 1984.

BROWN, I. M.; GAUGLER, R. Temperature and humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematodes. **Nematologica**, Leiden, v. 43, n. 5, p. 363-375, Sept. 1997.

BURMAN, M.; PYE, A. E. *Neoplectana carpocapsae*: respiration of infective juveniles. **Nematologica**, Leiden, v. 26, n. 2, p. 214-218, May 1980.

DEMPSEY, C. M.; GRIFFIN, C.T. Phased activity in *Heterorhabditis megidis* infective juveniles. **Parasitology**, New York, v. 124, n. 6, p. 605-613, June 2002.

DUTKY, S. R.; THOMPSON, J. V.; CANTWE, G. E. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. **Journal of Insect Pathology**, San Diego, v. 6, n. 4, p. 417-422, 1964.

FERRAZ, L. C. C. B. Nematóides entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 541-569.

FITTERS, P. F. L.; GRIFFIN, C. T. Spontaneous and induced activity of *Heterorhabditis megidis* infective juveniles during storage. **Nematology**, Leiden, v. 6, n. 6, p. 911-917, Nov. 2004.

FLANDERS, K. L.; MILLER, J. M.; SHIELDS, E. J. *In vivo* production of *Heterorhabditis bacteriophora* 'Oswego' (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 89, n. 2, p. 373-380, Apr. 1996.

GAUGLER, R.; BROWN, I.; SHAPIRO-ILAN, D.; ATWA, A. Automated technology for in vivo mass production of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, San Diego, v. 24, n. 2, p. 199-206, June 2002.

GLAZER, I. Survival biology. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 169-188.

GREWAL, P. S. Anhydrobiotic potential and long-term storage of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 14, p. 995-1000, Dec. 2000.

GREWAL, P. S.; LEWIS, E. E.; GAUGLER, R.; CAMPBELL, J. F. Host finding behaviour as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. **Parasitology**, New York, v. 108, n. 2, p. 207-215, Feb. 1994.

HASS, B.; DOWNES, M. J.; GRIFFIN, C. T. Persistence of four *Heterorhabditis* spp. isolates in soil: role of lipid reserves. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 34, n. 2, p. 151-158, June 2002.

KAYA, H. K.; STOCK, P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L. **Manual of techniques in insect pathology**. New York: Academic Press, 1997. p. 281-324.

KUNG, S. P.; GAUGLER, R.; KAYA, H. K. Influence of soil pH and oxygen on entomopathogenic nematode persistence. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 22, n. 4, p. 440-445, Oct. 1990.

LEWIS, E. E.; SELVAN, S.; CAMPBELL, J.F.; GAUGLER, R. Changes in foraging behaviour during the infective stages of entomopathogenic nematodes. **Parasitology**, New York, v. 110, p. 583-590, 1995.

LEWIS, E. E.; SHAPIRO-ILAN, D. Host cadavers protect entomopathogenic nematodes during freezing. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 81, n. 1, p. 25-32, Oct. 2002.

LEY, P.; MUNDO-CAMPO, M. Cultivation of nematodes. In: CHEN, Z. X.; CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. **Nematology advances and perspectives**. New York: CABI, 2004. p. 541-619.

MENTI, H.; PATEL, M. N.; WRIGHT, D. J.; PERRY, R. N. Lipid utilisation during storage of the entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis megidis* from Greece and the UK. **Nematology**, Leiden, v. 5, n. 1, p. 31-37, 2003.

MOLINA J. P.; LÓPEZ N. J. C. Producción in vivo de tres entomonematodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. **Revista Colombiana de Entomología**, Bogotá, v. 27, n. 1/2, p. 73-78, 2001.

MOLINA J. P.; LÓPEZ, N. J. C. Supervivencia y parasitismo de nematodos entomopatógenos para el control de *Hypothenemus hampei*, (Coleoptera: Scolytidae) en frutos de café. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, Madrid, v. 29, n. 4, p. 523-533, oct./dic. 2003.

PARRA, J. R. P. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 1015-1037.

PATEL, M. N.; STOLINSKI, M.; WRIGHT, D. J. Neutral lipids and the assessment of infectivity in entomopathogenic nematodes: observations on four *Steinernema* species. **Parasitology**, New York, v. 114, n. 5, p. 489-496, May 1997.

TANADA, Y.; KAYA, H. Nematodes, nematomorphs and platyhelminthes. In: TANADA, Y.; KAYA, H. **Insect pathology**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 459-491.

WELCH, H. E. Nematode infections. In: STEINHAUS, E. A. **Insect pathology**. New York: Academic Press, 1963. p. 363-389.

WHITE, G. F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, Washington, v. 66, p. 302-303, 1927.

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. **Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: a handbook of biology and techniques**. Arkansas: Nematode Subcommittee of the Southern Regional, 1988. 30 p.

WRIGHT, D. J.; GREWAL, P. S.; STOLINSKI, M. Relative importance of neutral lipids and glycogen as energy stores in dauer larvae of two entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema feltiae*. **Comparative Biochemistry Physiology**, Oxford, v. 118, n. 2, p. 269-273, Oct. 1997.

WRIGHT, D. J.; PERRY, R. N. Physiology and biochemistry. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 145-168.

Tabela 1. Efeito dos substratos na sobrevivência (%) de juvenis infectantes de *Steinernema carpocapsae* A11 mantidos em suspensão aquosa, ao longo do tempo (Temperatura = 16 ± 1°C).

Tratamento	Dias*					
	30	60	90	120	150	180
Areia fina	97,2 ± 0,3 a	96,0 ± 0,3 a	89,9 ± 1,7 a	88,9 ± 0,6 a	62,8 ± 0,4 a	50,6 ± 1,7 b
Amido	97,1 ± 0,4 a	95,6 ± 0,5 a	92,1 ± 0,4 a	86,7 ± 0,6 a	63,1 ± 2,6 a	40,1 ± 2,8 c
Ágar	97,1 ± 0,6 a	93,9 ± 0,4 a	79,4 ± 1,2 b	78,2 ± 1,2 b	60,5 ± 3,2 b	50,6 ± 1,4 b
Espuma	92,6 ± 1,4 b	92,8 ± 0,7 a	89,3 ± 1,3 a	87,0 ± 1,3 a	64,5 ± 1,5 a	57,5 ± 0,1 a
Testemunha	93,3 ± 3,1 b	92,7 ± 0,4 a	86,4 ± 2,8 a	76,5 ± 1,8 b	36,7 ± 1,7 c	35,3 ± 1,3 d
Areia grossa	94,3 ± 0,8 b	94,4 ± 0,7 a	89,7 ± 2,7 a	87,6 ± 0,3 a	63,1 ± 0,8 a	52,5 ± 0,4 b
Solo	94,1 ± 1,0 b	92,3 ± 0,4 a	83,1 ± 2,2 b	78,3 ± 0,2 b	61,9 ± 1,3 a	43,0 ± 1,7 c
Argila expandida	90,7 ± 3,2 b	90,1 ± 0,4 a	74,8 ± 0,8 c	73,5 ± 0,9 b	56,7 ± 0,8 b	28,4 ± 1,6 e
Esponja fenólica	93,2 ± 2,2 b	93,0 ± 1,1 a	61,4 ± 1,1 d	56,4 ± 2,1 c	12,5 ± 0,8 d	11,0 ± 1,1 f
Plantmax	92,0 ± 1,2 b	92,6 ± 0,4 a	56,6 ± 1,6 e	54,2 ± 1,4 c	9,6 ± 0,9 d	9,3 ± 0,5 f

*Médias seguidas por letras distintas nas colunas dentro de cada tempo diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (P < 0,05). M ± EP (M).

Tabela 2. Efeito dos substratos na sobrevivência (%) de juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. JPM4 mantidos em suspensão aquosa, ao longo do tempo (Temperatura = 16 ± 1°C).

Tratamento	Dias*					
	30	60	90	120	150	180
Areia fina	94,6 ± 0,6 a	93,3 ± 1,3 a	87,7 ± 2,1 a	86,1 ± 1,7 a	63,0 ± 1,6 a	50,6 ± 1,1 a
Areia grossa	94,1 ± 0,4 a	92,9 ± 0,9 a	91,0 ± 1,3 a	87,5 ± 1,0 a	63,9 ± 2,7 a	53,1 ± 2,6 a
Ágar	88,6 ± 2,4 a	88,4 ± 0,5 a	58,5 ± 2,1 e	58,0 ± 0,9 d	22,3 ± 1,9 d	19,3 ± 0,7 d
Amido	89,3 ± 1,3 a	85,5 ± 1,3 b	90,0 ± 1,2 a	84,7 ± 1,2 a	60,1 ± 0,7 a	38,4 ± 1,3 b
Argila expandida	91,7 ± 0,6 a	90,0 ± 0,7 a	74,9 ± 1,2 d	68,6 ± 1,7c	52,1 ± 0,7 b	29,6 ± 1,8 c
Espuma	91,3 ± 2,3 a	91,4 ± 0,7 a	84,3 ± 0,5 b	82,3 ± 0,7 a	62,7 ± 0,4 a	55,6 ± 0,7 a
Esponja fenólica	90,1 ± 0,9 a	87,9 ± 1,1 a	52,5 ± 1,2 f	49,7 ± 1,2 e	13,3 ± 0,5 e	11,6 ± 0,2 e
Plantmax	91,6 ± 1,2 a	91,2 ± 0,7 a	51,4 ± 3,6 f	50,4 ± 0,6 e	10,8 ± 1,6 e	10,7 ± 1,1 e
Solo	94,0 ± 0,9 a	90,4 ± 1,8 a	77,5 ± 1,7 d	74,1 ± 0,3 b	54,3 ± 0,9 b	41,7 ± 2,2 b
Testemunha	92,1 ± 1,7 a	89,0 ± 0,5 a	80,9 ± 1,4 c	67,7 ± 2,6 c	30,0 ± 3,3 c	29,7 ± 1,2 c

*Médias seguidas por letras distintas nas colunas dentro de cada tempo diferem entre si pelo teste de Scott-

Knott (P < 0,05). M ± EP (M).

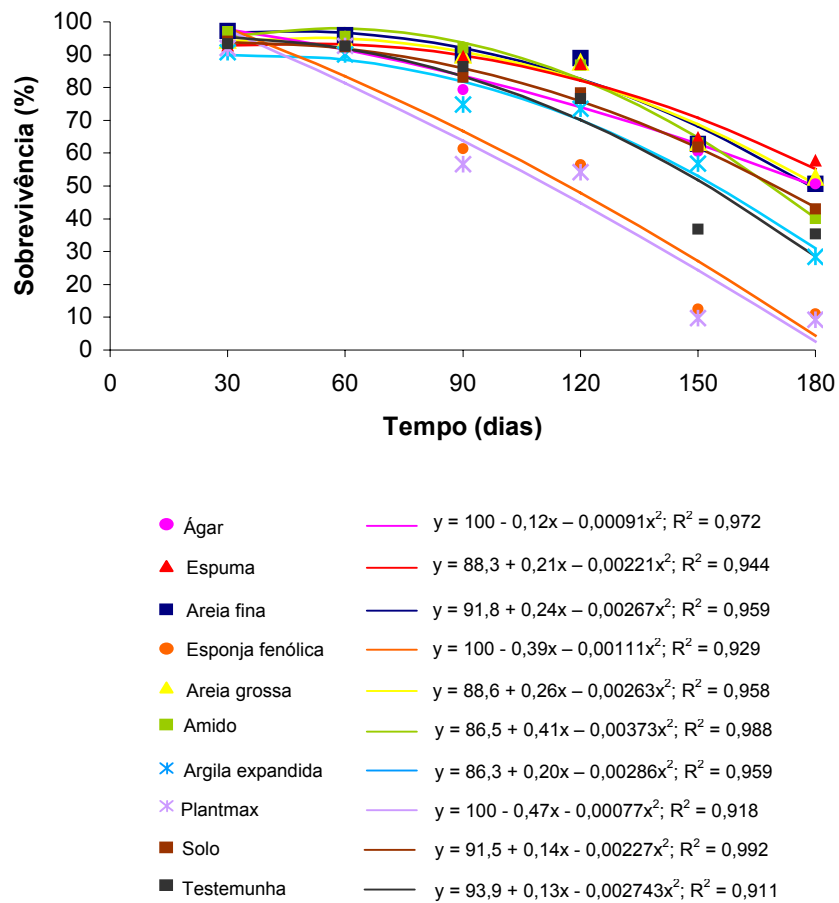


Fig. 1. Efeito do tempo na sobrevivência (%) de juvenis infectantes de *Steinernema carpocapsae* A11 mantidos em diferentes substratos.

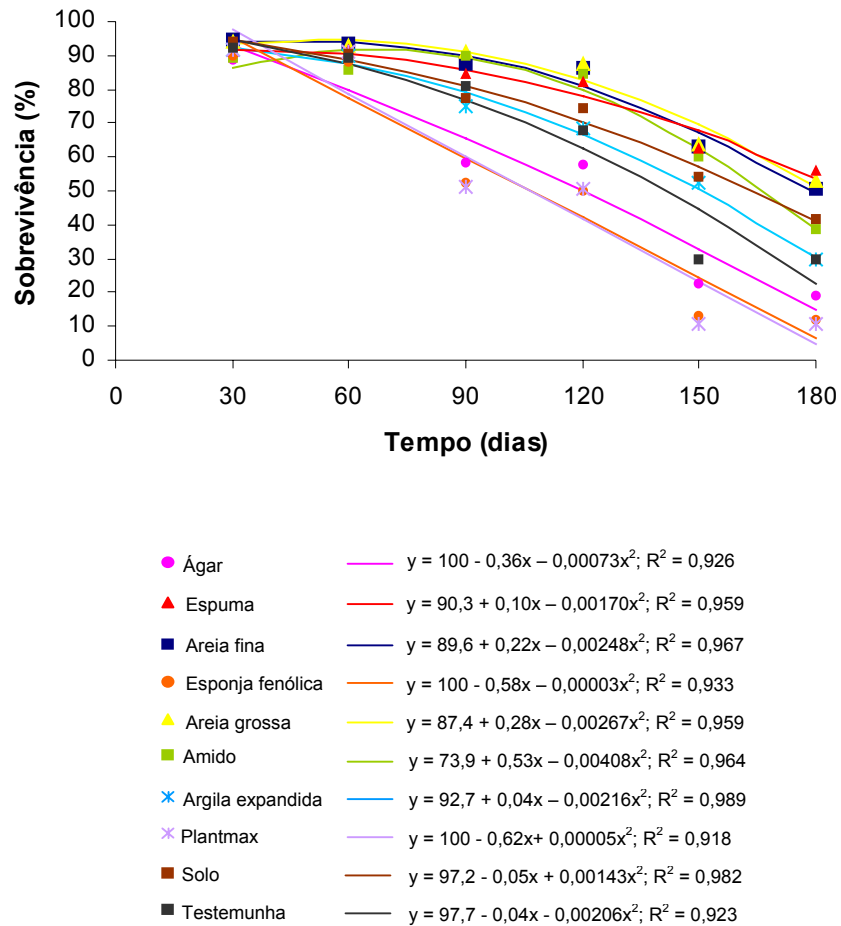


Fig. 2. Efeito do tempo na sobrevivência (%) de juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. JPM4 mantidos em diferentes substratos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de nematóides entomopatogênicos para o manejo de pragas no Brasil e no mundo vem crescendo, principalmente devido à busca por meios alternativos ao controle químico, levando a um maior interesse científico e comercial.

A distribuição das espécies de NEP no mundo mostra que a maioria encontra-se em países onde as pesquisas com esses organismos são avançadas. Assim, a quantidade de espécies isoladas não reflete a realidade de como estão distribuídos. Estudos para isolamento de populações nativas e testes de caracterização e identificação daquelas já isoladas são necessários para potencializar o uso desses organismos em programas de manejo de pragas.

Nesse trabalho observaram-se diversos fatores que influenciam no armazenamento dos NEP, havendo variações nas melhores condições para cada espécie. De forma geral, obteve-se que o uso de um substrato adequado pode auxiliar na sobrevivência dos juvenis infectantes, mantendo-os vivos por mais tempo. Além disso, o uso da glicerina como agente conservante é útil quando o nematóide é submetido a temperaturas altas, ou caso não exista controle da temperatura. Outro fator de importância é a quantidade de lipídios presentes nos nematóides e como eles são gastos, pois influenciam criticamente na sua viabilidade e infectividade. O uso de oxigênio em suspensão aquosa é outro fator que permite maior manutenção da sobrevivência desses organismos, e temperaturas extremas foram consideradas limitantes para a sua sobrevivência.

Observando as variações entre as condições ideais para cada espécie, confirma-se a importância da identificação do organismo a fim de que esse nematóide possa ser corretamente utilizado. A seleção de isolados de NEP melhor adaptados para uso comercial depende de um detalhado conhecimento de seus atributos fisiológicos e bioquímicos para aumentar sua eficácia.